

DIE RETROVIRALEN ELEMENTE:
EIN ZELLULÄRER REVERSE
TRANSKRIPTASE APPARAT?

Ralph Dornburg

Diss
München
1986

DIE RETROVIRALEN ELEMENTE:

EIN ZELLULÄRER REVERSE TRANSKRIPTASE APPARAT?

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ralph Dornburg
aus München

München, 1985

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Cleve
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Schmieger
Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.1986

Meiner Patin

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider danke ich für den Arbeitsplatz, die großzügig zur Verfügung gestellten Mittel und die wissenschaftliche Anleitung der Arbeit.

Herrn Prof Dr. H. Cleve danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. H.Mondal und Herrn Dr. G. Bauer sowie allen Kollegen der Abteilung für die hilfreiche Diskussion der Ergebnisse bedanken.

Fräulein C. Schmitt danke ich für die DNA-Sequenzierung der klonierten cDNA-Proben, Frau Dick und Fräulein Hankel für ihre Hilfe und Anleitung in der Gewebekultur.

Herrn Dr. Hofmann bin ich für die Hilfe bei der Erstellung der Computerprogramme zu Dank verpflichtet, mit denen die gezeigten Graphiken angefertigt sowie die Molekulargewichte der unbekannten DNA-Banden berechnet wurden.

Herrn Dr. P. Földi der Fa. LKB danke ich für die Hilfe bei technischen Problemen mit der HPLC-Anlage.

Herrn Dr. H. Delius danke ich ganz besonders für die Anfertigung elektronenemikroskopischer Präparate.

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	4
2.1 Entdeckung der Retroviren - Ein Historischer Rückblick	6
2.2 Aufbau der RNA-Tumoviren	7
2.3 Das Genom der RNA-Tumoviren	8
2.4 Replikation der RNA-Tumoviren	10
2.5 Die Protovirus Hypothese	14
2.6 Endogene Retroviren	17
2.7 Entdeckung der Retroviralen Elemente	22
3. ERGEBNISSE	24
3.1 Charakterisierung der RVE-Partikel	24
3.1.1 Vergleich von RVE mit RAV-0-Viren im Saccharosegradienten	24
3.1.2 Handelt es sich bei dem RVE-Enzym um eine Reverse Transkriptase?	25
3.1.3 Enthalten die RVE der Hühner eine hochmolekulare RNA?	29
3.1.4 Ist die RVE-RNA mit der RNA von RAV-0 verwandt?	33
3.2 Standardisierung der molekularen Klonierung	37
3.2.1 Konstruktion des Vektorplasmids	37
3.2.2 Konstruktion des Linkerplasmids	40
3.2.3 Herstellung des T-getailten Vektors	42

3.2.4	Herstellung des G-getailten Linkers	48
3.2.5	Klonierung von AMV-RNA	51
3.3	Molekulare Klonierung und Charakterisierung der RVE-RNA	55
3.3.1	Handelt es sich bei den klonierten Proben um Huhn-spezifische Gene?	56
3.3.2	Sind die Klone A und B partikelspezifisch?	58
3.3.3	Klon A und B: Sequenzhomologien mit dem AMV-Genom	62
3.3.4	Sequenzierung von Klon A und Klon B	65
3.3.5	Klon A: Eine LTR-ähnliche Sequenz	69
3.3.6	Computersequenzvergleiche mit Klon B	75
3.3.7	Klon A und Klon B enthalten offene Leserahmen für hypothetische Proteine	77
3.3.8	Sind Klon A und Klon B unterschiedliche Splicingprodukte einer Geneinheit?	79
3.3.9	Die Sequenzen von Klon A und B sind in der Evolution hoch konserviert.	83
3.3.10	Handelt es sich bei den Retroviralen Elementen um Vertebraten-Transposons?	87
3.3.11	Klon B: "Nachbar" eines chromosomalen Neuordnungsereignisses	89
4.	DISKUSSION	94
4.1	HPLC - eine alternative Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren	95
4.2	Charakterisierung der RVE-cDNA Klone	96
4.3	Klon B - "Nachbar" einer Transposonaktivität?	99
4.4	RVE - ein zellulärer Reverse Transkriptase-apparat?	101

4.5	Eine Reverse Transkriptionsmaschine - ein Vorteil für Organismus und Evolution?	105
4.6	Retrovirale Elemente, Evolution und die Protovirushypothese	107
5.	MATERIAL	114
6.	METHODEN	117
6.1	Bebrütung der Eier	117
6.2	Isolierung der RT-Partikel aus der Amnionflüssigkeit	117
6.3	Isolierung von RAV-O-Viren	118
6.3.1	Gewebekultur	118
6.3.2	Virusreinigung	119
6.4	Standardansatz für die Aktivitätsbestimmung von Partikel gebundener Reversen Transkriptase	119
6.5	Simultaner Nachweis von RT-Aktivität und einer hochmolekularen RNA	120
6.6	Radioaktivitätsmessungen	121
6.7	Extraktion von DNA und RNA	122
6.7.1	Präparation von Zellkernen	123
6.7.2	Verdauung der Proteinanteile mit Proteinase K	123
6.7.3	Phenolextraktion	124

6.8	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung	125
6.9	DNA-RNA und DNA-DNA Hybridisierung in flüssigem Medium	125
6.10	Reaktionen mit DNA und RNA modifizierenden Enzymen	126
6.10.1	Herstellung einer zur RNA komplementären DNA (cDNA)	126
6.10.2	Nicktranslation	127
6.10.3	Terminale Transferase	128
6.10.4	Verdau einzelsträngiger Nukleinsäuren mit S1-Endonuklease	130
6.10.5	Ligierung von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase	130
6.10.6	Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen	131
6.11	Isolierung bakterieller Plasmide	132
6.11.1	Anlegen von Bakterienkulturen	132
6.11.2	Plasmidisolierung	133
6.12	Plasmidisolierung nach Birnboim	134
6.13	Gelelektrophorese in Agarose	135
6.14	Southern Blot	137
6.15	Northern-Blot	140
6.16	Koloniehybridisierung	141
6.17	Klonierung von cDNA in bakteriellen Plasmiden	142

6.18	Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren	143
6.19	HPLC von Nukleinsäuren	143
6.20	Bestimmung unbekannter DNA-Fragmentgrößen	144
6.21	DNA-Sequenzierung	145
7.	ABKÜRZUNGEN	146
8.	LITERATUR	148

1. ZUSAMMENFASSUNG

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, daß alle untersuchten Vertebraten (Huhn, japanische Wachtel, Fasan, Ente, Rind und Mensch) eine partikelgebundene Reverse Transkriptase während der Embryonalentwicklung exprimieren. Das Enzym besitzt alle bekannten Funktionen der retroviralen Polymerasen, ist jedoch mit diesen immunologisch nur sehr wenig verwandt. Kürzlich gelang es zu zeigen, daß es im Zellkern sowohl in freier als auch partikelgebundener Form vorliegt.

Morphologisch ähneln diese Partikel C-Typ Retroviren. Sie sind jedoch weder infektiös noch können sie als Helferviren agieren. Die Expression ist streng mit der Differenzierung der Organe korreliert und läßt sich in ausdifferenzierten Geweben nicht mehr nachweisen. Simultane Nachweisteste ergaben, daß die Partikel der Japanischen Wachtel und des Menschen eine hochmolekulare RNA enthalten, deren Größen durch Dichtegradientenzentrifugationen auf 60S - bestehend aus zwei 30S RNAs - geschätzt wurden. Daher werden diese Partikel als retrovirale Elemente bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Partikel des Huhns ebenfalls über eine hochmolekulare RNA verfügen. Durch Hybridisierung in flüssigem Medium wird zunächst der Nachweis geführt, daß diese RNA zwar geringe Sequenzhomologien zu den Hühnerretroviren AMV und RAV-0 aufweist, aber nicht mit diesen identisch ist.

Die molekulare Klonierung dieser RNA, die nur in ng Mengen isoliert werden kann, sollte klären, ob es sich um eine RNA viralen oder zellulären Ursprungs handelt. Durch die Anwendung von HPLC gereinigten Vektoren- und Linker-DNAs gelang es schließlich, eine cDNA dieser RNA in bakteriellen Plasmiden zu amplifizieren.

Untersuchungen von zwei klonierten und sequenzierten 450 bp langen cDNA-Proben legen die Vermutung nahe, daß - im Gegensatz zu den Retroviren - zwei verschiedene 25S mRNA-Spezies in den Partikeln vorliegen. Beide Proben enthalten ein Polyadenylierungssignal, einen poly(A)-Tail und einen offenen Leserahmen für das Carboxylende eines hypothetischen Proteins.

Computersequenzvergleiche zeigen, daß das 3'Ende einer der beiden RNAs geringe Homologien zur LTR-Region des AMV-Genoms sowie zum LTR der intrazisternalen A-Partikel der Maus besitzt. Es weist jedoch signifikantere Übereinstimmungen zu den LTRs der Transposons von *Drosophila* (Copia-Elemente 17.6, 412 und FB4) auf. Die LTR-ähnliche Sequenz der retroviralen Elemente liegt jedoch nur einmal im Genom vor und flankiert somit keine Gene wie dies für integrierte Retroviren und Transposons zutrifft. Sie ist - im Gegensatz zu retroviralen LTRs - in der Evolution hoch konserviert und wird bei allen weiteren untersuchten Spezies (Japanische Wachtel, Fasan, Ente) ebenfalls als einzelne Kopie im Genom nachgewiesen.

Die Sequenz der zweiten RNA ist in der Evolution ebenfalls hoch konserviert. Sie zeigt zwar in einem ca. 100 bp umfassenden Bereich Homologien zu der RNA des ersten Klons, weist jedoch keine eindeutige Verwandtschaft zu den bekannten LTR-Sequenzen auf. Das dieser RNA entsprechende Gen liegt, auf chromosomaler Ebene mindestens 20 kb von der LTR-ähnlichen Sequenz entfernt, ebenfalls als einzelne Kopie vor. Die detaillierte Restriktionskartierung der chromosomalen DNA enthüllt weiterhin, daß der Nachbar-DNA-Bereich (ca. 500 bp neben der klonierten Sequenz) in zwei durch spezifische Restriktionsmuster definierten Allelen vorliegt. Untersuchungen an DNAs einzelner Individuen zeigen heterozygote sowie für das eine oder andere Allel homozygote Tiere.

Von besonderem Interesse ist jedoch der bei dieser Studie

gewonnene Befund, daß 3 von 10 untersuchten Individuen - entgegen den Mendelschen Regeln - eine ungleiche prozentuale Verteilung dieser beiden Allele (z.B. 90% Allel I; 10% Allel II) aufweisen. Daraus wird geschlossen, daß während der Embryogenese durch ein gezieltes und hochspezifisches chromosomales Neuordnungereignis ein ursprünglich homozygoter Zustand verloren geht und das zweite Allel "de novo" entsteht - also keine parentale Herkunft hat. Diese genetische Umstrukturierung betrifft sowohl somatische Zellen als auch die Keimbahn. Somit kann ein Tier, welches von beiden Eltern beispielsweise Allel I übernommen hat, Allel II an die Nachkommenschaft weiterreichen.

Es bleibt vorläufig ungeklärt, welcher Mechanismus (Inversion? Insertion eines unbekannten Transposons?) dem beobachteten chromosomalen Neuordnungereignis zugrundeliegt. Die von Temin vorgeschlagene Protovirushypothese, die zur Entstehung des retroviralen Genoms ein Zusammenführen von zellulären Genen durch Transposition mittels flankierender Transposons postuliert, rückt die Diskussion um eine Transposonaktivität als möglichen Mechanismus dieser genetischen Umstrukturierung in ein besonderes Licht. Die vorliegenden Daten lassen die Schlußfolgerung zu, daß die beschriebenen retroviralen Elemente per se keine Transposons darstellen. Die Anwesenheit einer reversen Transkriptase sowie einer für Retroviren untypischen RNA legen die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Elementen um von Transposons und Retroviren abzugrenzenden Partikeln (zellulärer Reverse Transkriptase Apparat?) handelt, die jedoch in der Evolution der Retroviren eine entscheidende Rolle eingenommen haben könnten. Detaillierte Modelle zur Physiologie der Partikel sowie zur Evolution von Transposons und Retroviren werden vorgeschlagen und diskutiert.

2. EINLEITUNG

Nachdem von Watson und Crick die Struktur der DNA als Doppelhelix erkannt (Watson, J.D. und Crick, J., 1953), und von Jacob und Monod das Prinzip der Verwirklichung der genetischen Information durch Transkription und Translation vorgeschlagen worden war (Jacob und Monod, 1961), galten unter Molekularbiologen lange Zeit folgende Dogmen (Crick, 1970):

- Die DNA ist ein fadenförmiges Molekül, auf dem gleichsam wie auf einer Perlenschnur die Gene nacheinander aufgereiht sind. Eine Umverteilung der Gene ist im Verlauf der Meiose durch "crossing over", Translokationen und ähnlichen Mechanismen möglich.
- Von der DNA werden Kopien der Information in Form von RNA angefertigt (Transkription), die dann an den Ribosomen in entsprechende Proteine übersetzt werden. Beide Vorgänge sind irreversibel.

Doch bereits in den 40er Jahren deuteten die von Barbara McClintock an Zea mais durchgeführten genetischen Experimente darauf hin, daß die DNA auch während der Ontogenese strukturellen Änderungen unterworfen sein kann. Sie postulierte "jumping genes", springende Gene, die durch Umstellung ihrer Position im Genom eine Änderung des Transkriptionsereignisses und damit der Genexpression bewirken. (McClintock, 1942, 1956, 1978)

Leider standen zu dieser Zeit noch keine Methoden zur

Verfügung, um dieses Postulat molekularbiologisch zu prüfen. So waren die springenden Gene für viele Wissenschaftler lange Zeit eher Anlaß zur Belustigung als zur weiteren Forschungsarbeit. Doch die Entdeckung der Restriktionsenzyme, molekulare Klonierung, und die Möglichkeit DNA zu sequenzieren, öffneten völlig neue Einsichten in das Genom von Bakterien, Viren und eukariotischen Zellen.

Als schließlich bei Bakterien erstmals ein genetisches bewegliches Element molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte (Jordan, Saedler und Starlinger, 1968), entwickelte sich eine intensive Forschung nach weiteren solchen Elementen. 1983 erhielt McClintock den Nobelpreis, nachdem die von ihr postulierten "jumping genes" - heute allgemein Transposons genannt - längst molekularbiologische Realität geworden waren.

Auch das zweite Dogma mußte sehr bald modifiziert werden, da von Temin und Baltimore in RNA-Tumoviren ein Enzym nachgewiesen werden konnte, welches von der viralen RNA basenkomplementäre DNA-Transkripte zu synthetisieren vermag, die wiederum - ähnlich wie die Transposons - in die Wirts-DNA integrieren.

Neuere Arbeiten der letzten beiden Jahre zeigen nun, daß die Transposition der beweglichen Elemente *Copia* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* vermutlich über eine RNA-Zwischenstufe und reverser Transkription erfolgt. Dieser Befund legt ein phylogenetisches Verwandtschaftsverhältnis zwischen RNA-Tumoviren und Transposons nahe. Aufgrund weiterer Ähnlichkeiten hatte wiederum Temin seit 1970 mehrmals postuliert, daß RNA-Tumoviren im Laufe der Evolution durch genetische Neuordnungserereignisse aus Transposons entstanden sind (Temin, 1970, 1974, 1980, 1982, 1984).

Zum Verständnis für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse sollen in der Einleitung zunächst die RNA-Tumor-

viren beschrieben werden. Nach Erläuterung des Aufbaus als auch der Molekularbiologie wird die Ähnlichkeit dieser Viren mit Transposons und die daraus resultierende "Protovirushypothese" Temins diskutiert, aus der sich durch die Entdeckung von retrovirusähnlichen Partikeln in uninfizierten Zellen die Fragestellung dieser Arbeit ergibt.

2.1 Entdeckung der Retroviren - Ein Historischer Rückblick

Die Entdeckung der Retroviren geht zurück in das Jahr 1908. Damals wurde von Ellermann und Bang (Ellermann und Bang, 1908 und 1909) erstmals gezeigt, daß ein über bakterien-dichte Filter gegebener Extrakt aus Hühnerleukämiezellen in Hühnern Leukämien hervorrufen kann. Damals wurden jedoch Leukämien nicht für neoplastische Krankheiten gehalten, und so führte diese Entdeckung lediglich zu einer Abgrenzung der Hühnerleukämien von den Leukämien anderer Tierarten.

Drei Jahre später gelang es Peyton Rous (Rous, 1911) mit zellfreien Extrakten aus Tumorzellen des Bindegewebes bei Hühnern Sarkome zu induzieren. Obwohl bereits 1914 dieser Befund bestätigt werden konnte (Fujinami und Inamoto, 1914), wurde die fundamentale Bedeutung dieser Versuche erst Jahrzehnte später erkannt. 1966 erhielt Rous den Nobelpreis für seine Pionierarbeit - für den erbrachten Nachweis, daß Tumore von Viren hervorgerufen werden können. Das Virus wurde nach seinem Entdecker Rous Sarkom Virus genannt (abgekürzt RSV).

In den letzten beiden Jahrzehnten stieß die Wissenschaft auf zahlreiche RNA-Tumoviren in weiteren Tierarten und auch im Menschen. Diese Ergebnisse führten zu der heute akzeptierten

Hypothese, daß RNA-Tumroviren in allen Vertebraten Leukämien und solide Tumore induzieren können.

2.2 Aufbau der RNA-Tumroviren

Obwohl bereits 1947 das RSV elektronenoptisch dargestellt wurde (Claude et al. 1947), konnten damals noch keine Aussagen über die Morphologie der RNA-Tumroviren getroffen werden. Erst die Entwicklung der Dünnschnitt-Technik und molekularbiologische Arbeitsmethoden brachten einen Durchbruch bei Studien über den Aufbau dieser Viren.

Es zeigte sich, daß alle bisher untersuchten RNA-Tumroviren einen Durchmesser von ca. 100 nm besitzen, wobei eine Lipiddoppelmembran ein sogenanntes Core umgibt (Schidlovsky, 1979;). Je nach Lage und Form dieses Cores werden diese Viren heute in A, B, C, oder D Typ Partikel eingeteilt.

In die Lipidmembran sind Glykoproteine eingelagert, die als "Spikes" im Elektronenmikroskop erkannt werden können, und die auch als Hüll- oder Env-Proteine bezeichnet werden (Env = envelope = Hülle). Das Core besteht aus Proteinen, welche die virusspezifische Nukleinsäure und Polymerase umgeben, und die Gag-Proteine genannt werden. Gag steht für Group specific Antigenes; deutsch: Gruppenspezifische Antigene, welche - wie der Name verrät - eine immunologische Klassifizierung dieser Viren ermöglichen.

2.3 Das Genom der RNA-Tumoviren

Wie bereits erwähnt ist RNA der Träger der genetischen Information der RNA-Tumoviren (Crawford und Crawford, 1961). Sie ist einzelsträngig, sedimentiert bei ca. 70S in einem neutralen Rohrzuckergradienten (Robinson und Baluda, 1965) und zerfällt nach Denaturierung in zwei 35S Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 3×10^6 Dalton (Duesberg, 1968).

Jede Untereinheit zeigt den typischen Aufbau einer mRNA, das heißt, sie besitzt ein 5' "Cap" (Furuichi et al. 1975; Keith et al. 1975; Rose et al. 1976), eine poly(A)-Region am 3'Ende (Stephenson et al. 1973) und enthält die vollständige genetische Information der Viren. Diese besteht bei den Leukämieviren aus drei, bei den Sarkomviren aus vier Genen, die wie folgt angeordnet sind:

5'RU5PB-gag-pol-env-U3R poly(A) 3'

5'RU5PB-gag-pol-env-src-U3R poly(A) 3'

Das Gag-Gen kodiert für ein Vorläuferprotein, aus dem durch posttranskriptionelle, proteolytische Spaltung vier Gag-Proteine entstehen (Vogt et al. 1975). Das Gen Pol kodiert für die Reverse Transkriptase. Die Genprodukte des Env-Genes sind die Glykoproteine der Hülle. Durch Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß das Genprodukt des Sarc-Genes für die Transformation von Hühnerfibroblasten in Gewebekultur verantwortlich ist (Toyoshima und Vogt, 1969; Martin, 1970).

Neben diesen für Proteine kodierenden Sequenzen enthält die RNA am 3' und am 5' Ende noch weitere nichtkodierende Bereiche, welche eine Rolle beim Replikationszyklus spielen. So findet man am 5'Ende direkt nach dem Cap eine 20 (Viren der Vögel) bis 80 bp (Viren der Säuger) lange Sequenz,

welche vor dem Poly(A)-Tail in identischer Basenfolge vorliegt (direkt repeat), und die mit R bezeichnet wird.

Der R-Region am 5'Ende folgt ein ca. 80 bp langer Abschnitt, dessen Sequenz bei allen Retroviren innerhalb einer Tierordnung (z.B. Säuger) hoch konserviert ist, und die U5 genannt wird (U von unique = einheitlich, 5 = 5'Ende). An die U5-Region grenzt eine kurze Sequenz, an die eine tRNA (Tryptophan-tRNA bei Vögelviren, Prolin-tRNA bei Säugerviren) hybridisieren kann, welche als Starter (=Primer) der Virus-Polymerase dient (PB = Primerbindungsstelle).

Analog zur U5-Region wird ein ca. 200 bis 500 b langer, nichtkodierender Bereich vor der R-Region des 3'Endes, welcher ebenfalls bei allen Retroviren nachgewiesen ist, als U3 bezeichnet (Chen und Barker, 1984).

Neben diesen "klassischen" Tumorstämmen sind heute in der Literatur eine Vielzahl weiterer Viren beschrieben, die zusätzliche Gene in ihrem Genom tragen, deren Expression zur malignen Transformation der Wirtszelle führt. Diese Gene werden als Onkogene bezeichnet. Es handelt sich hierbei meist um defektive Viren, die durch Rekombination mit einem Onkogen einen Teil der eigenen Erbinformation verloren haben und deshalb zur Replikation einen Helfervirus benötigen.

Heute wird allgemein vermutet, daß alle retroviralen Onkogene (z.B. das Sarc-Gen des RSV) durch Rekombination mit zellulären Genen in das virale Genom aufgenommen worden sind. Dies wird durch das Vorhandensein von zellulären Genen bestätigt, deren Nukleotidsequenzen mit den viralen Onkogenen in vielen Fällen fast identisch sind. Diese als Protoonkogene bezeichneten zellulären Sequenzen besitzen jedoch im Gegensatz zu den viralen Gegenstücken Introns (Review: Bishop, 1983).

2.4 Replikation der RNA-Tumoviren

Der Replikationszyklus von Viren kann in die drei folgenden Phasen eingeteilt werden: 1. Penetration, das heißt das Eindringen des Virus in die Wirtszelle, 2. Virusvermehrung, 3. Virusfreisetzung.

Bei der Penetration der Retroviren in die Wirtszelle findet zunächst eine Interaktion der Env-Proteine mit spezifischen Oberflächenantigenen der Wirtszelle statt. Während für die meisten Retroviren diese Rezeptoren unbekannt sind, konnte beispielsweise für den Erreger von AIDS (Human T-Cell Leukemia Virus Subtyp III = HTLV III), welcher selektiv T-Zellen befällt, der T4-Rezeptor als Erkennungsstruktur identifiziert werden.

Durch einen Vorgang, welcher als Pinozytose betrachtet werden kann, wird nun das Virion in die Zelle aufgenommen. Durch eine pH-Änderung innerhalb des aus diesem Vorgang resultierenden Einschlußkörpers verschmilzt die Lipidmembran des Virus mit der zellulären Membran, wodurch es zur Freisetzung der Corestruktur kommt. Damit werden dem Virus die notwendigen zellulären Faktoren (z.B. Nukleotidtriphosphate) zugänglich, welche es zur Vervielfältigung seiner Erbinformation benötigt.

In den Jahren um 1960 deuteten Versuche indirekt an, daß bei der Replikation der RNA-Tumoviren eine DNA-Zwischenstufe auftritt. Temin hatte beobachtet, daß die Vermehrung des Rous Sarkom Virus durch Inhibitoren der DNA-Synthese gehemmt werden konnte. Zum zweiten hatte er festgestellt, daß Aktinomycin D, ein Hemmstoff der Transkription, die Produktion von neuen Viren verhinderte.

Aus diesen Beobachtungen schloß er, daß sowohl DNA-Synthese als auch Transkription für die Replikation dieser Viren notwendig sind. Dies veranlaßte ihn, die Provirushypothese aufzustellen (Temin, 1964).

Sie besagt, daß von retroviraler RNA in der Zelle zunächst eine basenkomplementäre doppelsträngige DNA (=Provirus) synthetisiert wird, die als Replikationszwischenprodukt auftritt, und für die Transformation der Zelle verantwortlich ist. Dabei vermag das Provirus in die Wirtszell-DNA zu integrieren, wodurch nach einer Zellteilung beide Tochterzellen virale Erbinformation tragen. Die Transkription dieser DNA in virusspezifische RNA führt zur Expression viraler Proteine sowie zur Replikation der viralen RNA.

Diese Theorie stieß jedoch zunächst auf wenig Enthusiasmus, da ein Enzym zur Umschreibung von RNA in DNA nicht bekannt war. 1970 gelang es jedoch Temin und Baltimore gleichzeitig dieses postulierte Enzym in RNA-Tumerviren nachzuweisen (Temin und Mizutani, 1970; Baltimore, 1970).

Es wurde als RNA abhängige DNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase bezeichnet. Das heißt, es vermag DNA-Transkripte zu synthetisieren, die basenkomplementär zur viralen RNA sind. Aufgrund der Anwesenheit dieses Enzyms in den RNA-Tumerviren werden diese heute auch als Retroviren bezeichnet. Neben der Fähigkeit RNA revers zu transkribieren besitzt dieses Enzym ebenfalls eine DNA abhängige DNA-Polymeraseaktivität (Spiegelmann et al. 1970; Baltimore und Smoler, 1971). Zudem vermag es aus DNA-RNA-Hybriden den RNA-Anteil selektiv abzubauen (RNase H Aktivität) (Mölling et al. 1971).

Abbildung 1 zeigt den Vorgang der Umschreibung der viralen RNA in doppelsträngige DNA im Detail nach heutigen Vorstellungen (Reviews: Varmus, 1982; Hughes, 1983). Durch die Hybridisierung einer tRNA an die PB-Sequenz wird der

ABBILDUNG 1

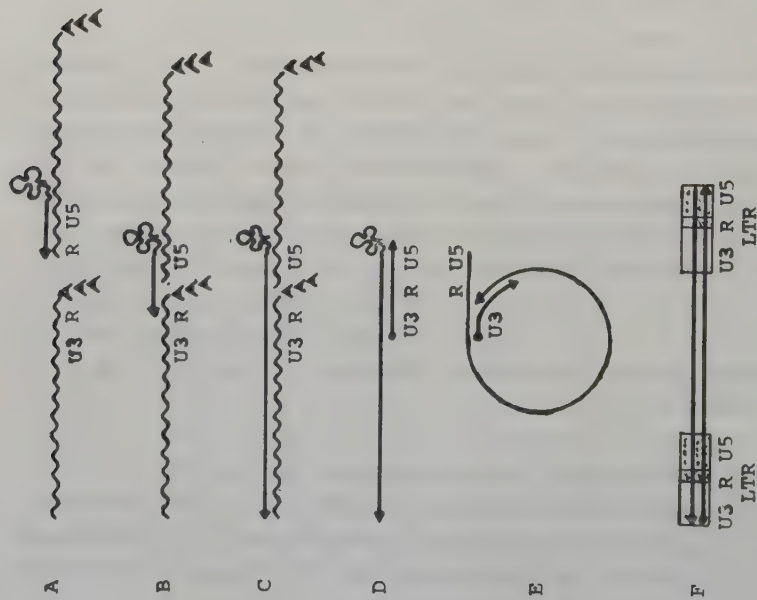


ABBILDUNG 2

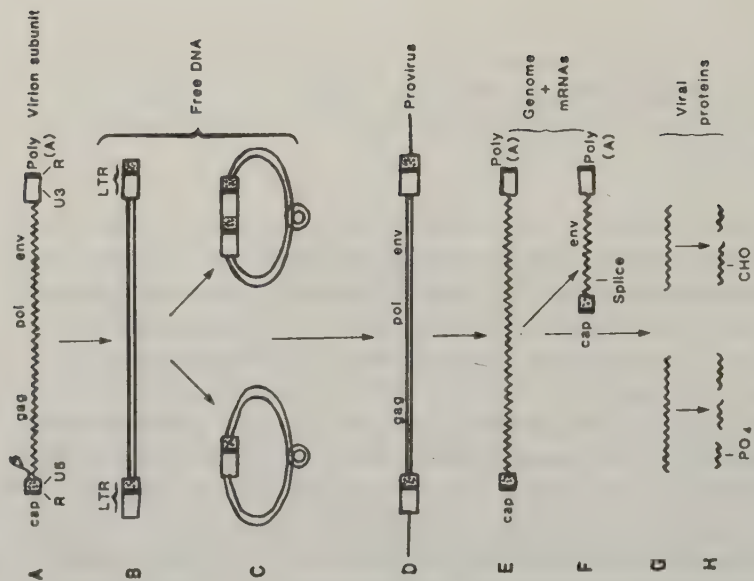


Abbildung 1 und 2: Replikation der Retroviren; die einzelnen Schritte sind im Text ausführlich beschrieben.

Reversen Transkriptase ein Primer zur Verfügung gestellt, von dem aus zunächst eine komplementäre DNA ((-)DNA) zum 5'Ende der RNA synthetisiert wird (Abb. 1 A). Durch die RNase H Aktivität dieses Enzyms wird der RNA-Anteil des resultierenden DNA-RNA-Hybrids abgebaut, wodurch das nun freie 3'Ende der (-)DNA mit der 3'R-Region der zweiten viralen Untereinheit basenpaaren kann (Abb. 1 B). Damit wird gleichzeitig ein Primer für die komplette (-)DNA-Synthese dieses Moleküls geliefert (Abb. 1 C).

Durch einen weiteren RNA-Primer (vermutlich ein Bruchstück der viralen RNA nach RNase H Verdau) wird nun die (-)DNA U3-R-U5 zum Doppelstrang aufgefüllt (Abb. 1 D). Diese (+)DNA-Synthese erfolgt ebenfalls durch die Viruspolymerase. Durch Aufschmelzung dieses doppelsträngigen Bereichs kann das 3'Ende der (-)DNA mit dem 3'Ende der (+)DNA basenpaaren. Durch das Auffüllen der verbliebenen Einzelstrangregionen entsteht ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül, welches nun an seinen Enden direkte redundante Sequenzen trägt. Diese werden als LTRs (long terminal repeat) bezeichnet (Abb. 1 F, vergleiche auch Abb. 2 A und B).

Nach Zirkularisierung integriert die nun als Provirus bezeichnete DNA in das Genom der Wirtszelle. Dabei wird sie exakt an der Verknüpfungsstelle der beiden LTRs geöffnet (Abb. 2 D). Neben den für die Integration "richtigen" Molekülen mit zwei LTRs werden in infizierten Zellen auch virale DNA-Moleküle mit nur einer LTR-Sequenz gefunden, deren biologische Bedeutung unklar ist (Abb. 2 C).

Während für die Integration des Provirus in die Wirts-DNA keine spezifische Nukleotidsequenzen als Erkennungssignale vorliegen müssen, (Shimotohno und Temin, 1980), spielt eine 20 bp lange Region auf den tandemorientierten LTRs dabei eine wesentliche Rolle. Dieser Abschnitt besteht aus 8 bp der U5-Region des einen und 12 bp der U3-Region des anderen LTRs und gewährleistet den für die Transkription richtigen

Einbau des Provirus (Panaghiam und Temin, 1984)

Durch die Integration in das Wirtszellgenom werden die Promotoren für die RNA-Synthese auf den LTR-Sequenzen von der zellulären RNA-Polymerase II erkannt, und neue virale RNAs transkribiert (Abb. 2 E). Ein Teil dieser RNA wird durch Splicing in drei den Geneinheiten Gag, Pol und Env entsprechenden mRNAs gespalten (Abb. 2 F), die zunächst in Precursorproteine translatiert werden (Abb. 2 G). Durch proteolytische Spaltung entstehen aus diesen die virusspezifischen Proteine (Abb. 2 H).

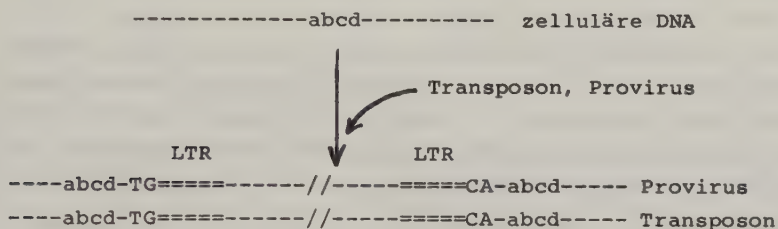
Für die Virusfreisetzung bilden die nicht prozessierten viralen RNAs im Zytoplasma mit den gebildeten Gag-Proteinen und der Reversen Transkriptase Virus-Cores, die mit den in die Zellmembran eingebauten viralen Env-Proteinen in Wechselwirkung treten. Durch einen Vorgang, der "Budding" oder "Knospung" genannt wird, und der als Umkehrung der Pinocytose betrachtet werden kann, werden letztlich neue Viren aus der Wirtszelle ausgeschleust.

2.5 Die Protovirus Hypothese

Wie bereits erwähnt, zeigen Retroviren und Transposons eine Reihe gemeinsamer Merkmale. Um darauf näher eingehen zu können, ist es notwendig, die Natur des Provirus und seinen Integrationsvorgang noch genauer zu beschreiben.

Bei der Integration des Provirus in die Wirtszell-DNA wird eine 4 bis 6 bp umfassende Sequenz der chromosomalen DNA dupliziert, die somit den Provirus flankiert (Shimotohno et al. 1980; Dhar et al. 1980). Derartige Duplikationen sind

bei Insertionsvorgängen der genetisch beweglichen Elemente aus Bakterien Hefe und *Drosophila* beschrieben (Dunsmuir et al. 1980; Reviews: Kleckner, 1981; Rubin et al. 1983). Sequenzanalysen an den Integrationsstellen haben weiterhin gezeigt, daß sowohl alle bisher untersuchten integrierten Proviren als auch Transposons sowie der Bakteriophage Mu mit den Dinukleotiden TG.....CA enden (Allet, 1979). Zudem enthalten viele Transposons analog den Retroviren LTR-Sequenzen als direkte Repeats.



Nach Temin (Temin, 1980) sind diese Homologien so signifikant, daß sie nicht als Zufall interpretiert werden dürfen. Da bestimmte DNA-Viren, wie zum Beispiel SV40, in das Wirtsgenom integrieren, ohne dabei eine chromosomale DNA-Sequenz zu duplizieren, kann ein Selektionsdruck für eine erfolgreiche Integration via des beschriebenen Mechanismus ausgeschlossen werden.

Deshalb vermutet Temin weiter, daß Retroviren aus genetischen, beweglichen Elementen entstanden sind und schlug folgendes Modell vor (Temin 1980):

Zum Beispiel könnte ein kleines Insertionselement, das bei dem sogenannten Vorgang der Transposition eine kurze DNA-Sequenz dupliziert, und welches Kontrollsequenzen für die Transkription trägt, der erste Vorläufer der Retroviren gewesen sein. Als Insertionselemente bezeichnet man kurze DNA-Sequenzen (ca. 700-1500 bp), die durch Änderung ihrer Position im Genom eine An- beziehungsweise Abschaltung von

Genen bewirken. Im Gegensatz zu Transposons enthalten sie keine kodogenen Sequenzen und stellen somit rein regulatorische Elemente dar.

Man kann sich vorstellen, daß zwei solche Elemente "links" und "rechts" von einem Polymerasegen integrieren. Aus dem Polymerasegen entstand das Gen für die Reverse Transkriptase, während die flankierenden Sequenzen zu den LTR-Sequenzen wurden. Außerdem formten sie ein Transposon für die Reverse Transkriptase.

Zwei solche Transposons können nun, wie oben beschrieben, ein weiteres Gen - zum Beispiel den Vorläufer der Gag-Proteine nach Transposition - flankieren. Durch Deletion und Mutation entstand ein neues Transposon, aus dem durch einen weiteren solchen Vorgang die Retroviren entstanden sein könnten.

In diese Hypothese fügt sich der neuerliche Befund, daß die Transposition des genetischen beweglichen Elements Copia der Fruchtfliege möglicherweise über eine RNA-Zwischenstufe und reverse Transkription erfolgt (Shiba und Saigo, 1984). Das Transposon selbst enthält Nukleotidsequenzen, die Homologien zu den retroviralen Pol-Genen zeigen (Saigo et al. 1983).

Bewegliche genetische Elemente konnten bis heute nur in Mais, Bakterien, Hefe und Dipteren gefunden werden, nicht aber in Vertebraten, während Retroviren mit Sicherheit nur bei Vertebraten nachgewiesen sind. Daraus kann die attraktive Hypothese abgeleitet werden, daß Retrovirus ähnliche Strukturen - von Temin Protoviren genannt - in Vertebraten die Rolle von Transposons besitzen, und/oder eine Rolle in der Zelldifferenzierung ausüben.

Diese Hypothese postuliert somit die Gegenwart von zellulären Genen in allen Vertebratenzellen, welche folgende Eigenschaften aufweisen sollten:

- (1) Die Expression dieser Gene führt zur Bildung von zellulären, retrovirusähnlichen Elementen.
- (2) Die Gene sind von LTR-ähnlichen Sequenzen flankiert.
- (3) Die Expression ist essentiell für zellphysiologische Ereignisse.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein solcher Elemente gaben bereits Ende 1960 durchgeführte Experimente, die zeigten, daß RNA-Tumovirusgene vererbt werden können. Diese Befunde veranlassten Temin 1971 erstmals zur Formulierung der Protovirushypothese (Temin, 1971); zu einer Zeit also, zu der noch keine detaillierten, molekularbiologischen Daten bezüglich der Transposons und der Proviren vorlagen.

2.6 Endogene Retroviren

1966 beschrieben Dougherty und Di Stephano in uninfizierten Hühnerzellen leukoseviruspezifische Gag-Strukturen (Dougherty and Di Stephano, 1966), deren Expression unter der Kontrolle eines autosomal dominanten Gens steht (Payne und Chubb, 1968).

Weitere Arbeiten zeigten, daß durch die Expression von zellulären Env-Genen in embryonalen Hühnerzellen ein Defekt im Env-Gen eines bestimmten AMV-Stammes komplementiert werden kann (Hanafusa et al. 1970; Weiss, 1969). Schließlich gelang es Weiss und Biggs durch Röntgenstrahlung sowie durch mutagene und karzinogene Substanzen einen Leukämievirus zu induzieren, der nicht auf Hühnerzellen propagiert werden

konnte, sich aber als infektiös für Fasanzellen erwies (Hanafusa et al. 1970, Vogt und Friis, 1971; Weiss und Biggs, 1972). Dieses Virus wird heute RAV-0 genannt (Rous assoziiertes Virus - 0).

Hybridisierungsexperimente mit viraler RNA oder mit zu viraler RNA komplementärer DNA durch verschiedene Arbeitsgruppen bestätigten die Anwesenheit viraler Nukleotidsequenzen im Genom von uninfizierten Hühnerzellen (Neiman, 1973; Rosenthal et al. 1971).

Somit war gezeigt, daß einzelne Retrovirusgene und komplette Proviren im Vogelzellgenom integriert sind und mendelisch weitervererbt werden. Da retrovirale Erbinformation - deren Expression zur Bildung sogenannter "endogener Viren" führen kann - später auch im Genom weiterer Tierarten nachgewiesen werden konnte, vermutet man heute, daß alle Vertebraten Proviren in ihrem Genom tragen.

Das ubiquitäre Auftreten retroviraler Erbinformation in den Genomen von Vertebraten und erste Befunde, daß diese Gene zu bestimmten Zeiten der Embryogenese exprimiert werden, gab Anlaß zu der Hypothese, daß endogene retrovirale Sequenzen eine physiologische Rolle in der Zelldifferenzierung ausüben und möglicherweise ein Relikt der Evolution der Retroviren darstellen. Wie jedoch im folgenden ausführlich dargestellt werden soll, konnte diese Hypothese durch zahlreiche weitere Experimente nicht aufrecht erhalten werden.

Detaillierte Untersuchungen der Genorte (Loci) des endogenen Retrovirus RAV-0 führten zu der Erkenntnis, daß solche Proviren in verschiedenen Hühnerstämmen an unterschiedlichen Stellen in das Genom integriert sind. Heute sind mehr als 16 Loci beschrieben, die mit ev (endogener Virus) bezeichnet werden.

Die Expression von 6 dieser Loci führt zur Produktion von

Viruspartikeln, die sich mit Ausnahme der Produkte eines Genortes als infektiös erwiesen. Alle weiteren Genorte enthalten entweder defekte Proviren, welchen durch Deletionen die Fähigkeit zur Bildung kompletter Partikel fehlt, oder deren Expression von zellulären Faktoren inhibiert ist (z.B. Methylierung bei *ev 1*). Die Expression defekter Proviren kann zur Synthese von Gag- oder Env-Proteinen führen. Die daraus resultierenden Phänotypen werden mit gs^+ (=positiv für Gag-Proteine), bzw. chf^+ (chf = chicken helper factor = positiv für Env-Proteine) genannt. Tabelle 1 faßt die Resultate der molekularbiologisch am besten untersuchten Loci zusammen.

Wie daraus ersichtlich ist, liegen diese auf unterschiedlichen Chromosomen. Durch die Kreuzung von Tieren mit unterschiedlichen *ev*-Loci nach Mendelschen Regeln gelang es Astrin, einen Hühnerstamm zu züchten, der frei von endogenen Viren ist (Astrin et al. 1979, Rovigatti und Astrin, 1983). Diese Tiere entwickeln sich vollkommen normal und unterscheiden sich in keiner Weise von Hühnern, die RAV-0-Sequenzen in ihrem Erbgut tragen. Somit kann ausgeschlossen werden, daß alle bisher bekannten endogenen Retroviren einen essentiellen Beitrag bei der embryonalen Zelldifferenzierung leisten (Jaenisch, 1982; Tereba, 1983). So wird heute im allgemeinen angenommen, daß endogene Retroviren das Produkt von Keimzellinfektionen darstellen, die im Laufe der letzten 50 000 Jahren stattfanden.

Möglicherweise bieten jedoch die Anwesenheit und Expression dieser Sequenzen, insbesondere des Env-Gens, einen Schutz vor exogenen Retrovirus Infektionen. Es ist seit langem bekannt, daß Zellen, die mit Viren eines bestimmten Subtyps infiziert sind, in hohem Maße einer weiteren Virusinfektion des gleichen Subtyps widerstehen. Vermutlich blockieren in die Zellmembran eingelagerte virale Proteine die zellulären Rezeptoren, wodurch die Penetration weiterer Viren verhindert wird. Dieses Interferenz-Phänomen wurde auch für

TABELLE 1:

Locus	Chrom.	assoz. Phenotyp	mwt. SstI Fragment	RNA-Transkripte	RNA-Copien pro Zelle	vorgeschlagene Genomstruktur
ev 1	1	chf ⁻ gs ⁻	5, 8		35S 21S	gag pol env c ===<>-----+-----+<>===
ev 2	2	v ⁺	3, 7		35S 21S	gag pol env c ===<>-----+-----+<>===
ev 3	M.Chr.	chf ⁺ gs ⁺	3, 9		31S 21S 19S	gag pol env c =====+-----+<>=====
ev 6	1	chf ⁺ gs ⁻	13		28S 21S	pol env c =====+-----+<>=====
ev 9	?	chf ⁺ gs ⁻	14		34S 21S	gag pol env c ===<>-----+-----+<>===

Nomenklatur, Integration und Expression von endogenen retroviralen DNA-Sequenzen (RAV-0) im Hühnergenom: Chrom.: Chromosom, auf dem die viralen Gene lokalisiert werden konnten, M.Chr. = Mikrochromosom (Tereba, A. und Astrin, S.M. 1980, Tereba, A. et al 1981); assoz. Phenotyp: assoziierter Phenotyp chf⁺ / chf⁻ = virale env-gene werden exprimiert / nicht exprimiert, gs⁺ / gs⁻ = virale gag-gene werden exprimiert / nicht exprimiert, v⁺ = Produktion von RAV-0-Viruspartikeln (Astrin, S.M. et al 1980); SstI Fragment: Molekulargewicht der mit SstI verdauten chromosomalen DNA-Fragmente, die im Southern-Blot mit radioaktiv markierter viraler RNA hybridisieren (x10⁶ Dalton); RNA-Transkripte: o = starker Promotor für ribosomale Bindung, • = vermutlich defekter Promotor durch strong-stop Sequenzen und daher keine Bindung an Ribosomen, d.h. keine Translation möglich; vorgeschlagene Genomstruktur: === : zelluläre DNA-Sequenzen, --- : provirale DNA-Sequenzen. <> : LTR = lange terminal wiederholte Sequenzen (Astrin, S.M. 1978, Astrin, S.M. et al 1979, Hayward, W.S. et al 1980). Nähere Erläuterung siehe Text.

gewisse *ev*-Loci beschrieben (*ev* 3, 6, 9), die große Mengen an Env-Protein produzieren (*chf*⁺) (Robinson et al. 1981).

Als weitere mögliche "Missing Link" Kandidaten in der Evolution der Retroviren aus zellulären Elementen können die intrazisternalen A-Partikel (IAP) der Maus diskutiert werden. Diese ähneln morphologisch den Retroviren und werden in vielen embryonalen und transformierten Zellen exprimiert (Dalton et al. 1961; Kuff et al. 1972). Sie besitzen eine Reverse Transkriptase (Wilson und Kuff, 1972) und eine RNA, die für alle Partikelproteine kodiert (Yang und Wivel, 1973; Paterson et al. 1978). Im Gegensatz zu den RNA-Tumoviren sind sie jedoch extrazellulär nicht nachweisbar, knospen in das endoplasmatische Retikulum und sind nicht infektiös.

Das Genom der Mäuse enthält ca. 1000 Gene, welche für die IAP-RNA kodieren (Lueders und Kuff, 1977, 1980) und die - wie durch Untersuchung einiger dieser Genorte belegt ist - alle oben erläuterten strukturellen Merkmale von Proviren und Transposons besitzen (Ono et al. 1980, Cole et al. 1981, Kuff et al. 1981, 1983). Die IAP-RNA zeigt nur wenige Sequenzhomologien zu retroviralen Genomen, während die LTR-Sequenzen signifikante Übereinstimmungen mit den LTRs der Copia-Elemente aufweisen. Neuere Experimente zeigen, daß diese Partikel über die Fähigkeit zur Transposition verfügen (Hawley et al. 1984, Canaani et al. 1984). Deshalb stellen sie möglicherweise - im Gegensatz zu früheren Annahmen - keine endogenen Retroviren, sondern Copia-ähnliche Elemente der Maus dar. Aus dem Blickwinkel der Protovirushypothese betrachtet, könnten diese Elemente also "Protoviren" repräsentieren.

2.7 Entdeckung der Retroviralen Elemente

1976 fand Bauer in der Allantoisflüssigkeit von leukosevirusfreien Hühnereiern eine Partikel gebundene Reverse Transkriptase (Bauer und Hofschneider, 1976). Diese unterschied sich in ihren immunologischen Eigenschaften von allen bekannten homologen Enzymen der Retroviren (Bauer et al. 1977a, 1977b, 1978a).

Die enzymtragenden Partikel sind nicht infektiös, können nicht als Helferviren agieren, und sie unterscheiden sich nach ersten Ergebnissen in ihrer Proteinzusammensetzung von allen bekannten Retroviren. Die Expression ist bei allen untersuchten Spezies (japanische Wachtel, Mensch) streng mit der Differenzierung der Organe während der Embryogenese verknüpft. Sie läßt sich in ausdifferenzierten Zellen nicht mehr nachweisen (Mondal et al. 1980, 1983).

Simultane Nachweisteste ergaben, daß diese Partikel ebenfalls eine hochmolekulare RNA enthalten, deren Größe durch Analysen in Saccharose Dichtegradienten auf ca. 60S geschätzt wurde. Hybridisierungsexperimente mit cDNAs dieser RNA enthüllen eine schwache Homologie zu retroviralen Genomen (Mondal und Hofschneider, 1982, 1983).

Aufgrund dieser Kriterien wurden diese Partikel als Retrovirale Elemente bezeichnet, um sie von den bekannten exogenen und endogenen Retroviren abzugrenzen.

Die strenge Korrelation der Expression mit der Organdifferenzierung erlaubt die Hypothese, daß diese Elemente einen Beitrag zur Zelldifferenzierung leisten. Als mögliche Funktionen könnten eine Transposonaktivität zur Regulierung von Differenzierungsgenen oder ein Apparat zur transienten Amplifikation von Genen (reverse Transkription von mRNA)

genannt werden.

Diese Hypothesen sollten durch molekularbiologische Experimente mit der partikeleigenen Nukleinsäure überprüft werden. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, war es notwendig die RVE-RNA zu klonieren (cDNA-Klonierung), um genügend Material für die durchzuführenden Versuche zu erhalten.

Als Modellsystem erwies sich das Huhn aus zwei wesentlichen Gründen als äußerst vorteilhaft:

- (1) Die Partikel (und damit die RNA) können aus der Amnionflüssigkeit ohne erschwerende Verunreinigungen isoliert und gereinigt werden.
- (2) Die ev-Genorte des Huhns sind sehr gut untersucht. Sie können somit zum Vergleich mit den RVE-Genen herangezogen werden, um die Frage zu klären, ob die RVE-RNA zellulären oder viralen Ursprungs ist.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der RVE-Partikel

Bevor mit molekularen Klonierungsarbeiten begonnen werden konnte, mußte zunächst geprüft werden, ob die von Bauer beschriebenen Partikel der Hühner eine RNA enthalten, und ob diese sich von der RNA des endogenen Virus RAV-0 unterscheidet. Dazu mußten zunächst RVE sowie RAV-0 gereinigt und charakterisiert werden.

3.1.1 Vergleich von RVE mit RAV-0-Viren im Saccharosegradienten

Aus der Amnionflüssigkeit (ca. 550 ml) von 200 befruchteten und 12 Tage bebrüteten Hühnereiern wurden die RVE-Partikel - wie im Methodenteil beschrieben - angereichert und in einem Saccharosedichtegradienten (10-50%) analysiert (6.2). Dazu diente ein Enzymtest mit dem synthetischem Template/Primer poly(rC).oligo(dG), für den das Enzym Reverse Transkriptase eine hohe Spezifität aufweist. Zum direkten Vergleich wurde in einem weiteren Gradienten das Sedimentationsverhalten von RAV-0-Viren (100 000 g Pellets aus ca. 600 ml Gewebekulturüberstand) unter identischen Bedingungen geprüft.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Im Falle der RVE-Partikel (Abbildung 3a) kann bei einer Dichte von 1,15 g/ml ein deutlicher Anstieg an säurefällbarer Radioaktivität (145 000 cpm in Fraktion 13) beobachtet werden - ein Hinweis auf die Präsenz einer partikelgebundenen Reversen Transkriptase. Im Falle von RAV-0 liegt die Ansammlung an Radioaktivität (2 300 000 cpm in Fraktion 11, Legende 3b) bei einer Dichte von 1,17 g/ml vor.

Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von Bauer, der für die RVE-Partikel ebenfalls eine Dichte von 1,15 g/ml (Bauer, G. et al. 1976) angibt. Die Sedimentationsdichte von Rav-O-Viren ist mit 1,17 g/ml beschrieben.

Dieses Experiment liefert damit den ersten Fingerzeig, daß sich die RVEs der HÜHNER von RAV-0-Viren unterscheiden. Da jedoch der beobachtete Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide in säureunlösliches Material ebenso auf die Anwesenheit einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und einer DNA-Kontamination (Nicktranslation) oder auf die Aktivität einer Terminalen Transferase zurückgeführt werden kann, war es notwendig, das Enzym durch weitere Tests als Reverse Transkriptase eindeutig zu klassifizieren.

3.1.2 Handelt es sich bei dem RVE-Enzym um eine Reverse Transkriptase?

Um das RVE-Enzym eindeutig als Reverse Transkriptase zu identifizieren, wurden mit je 30 μ l der Peakfraktion Enzymteste mit verschiedenen Templates und Primer durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Enzymaktivitäten der Reversen Transkriptase von RAV-0, der DNA-Polymerase und einer Terminalen Transferase unter identischen Bedingungen

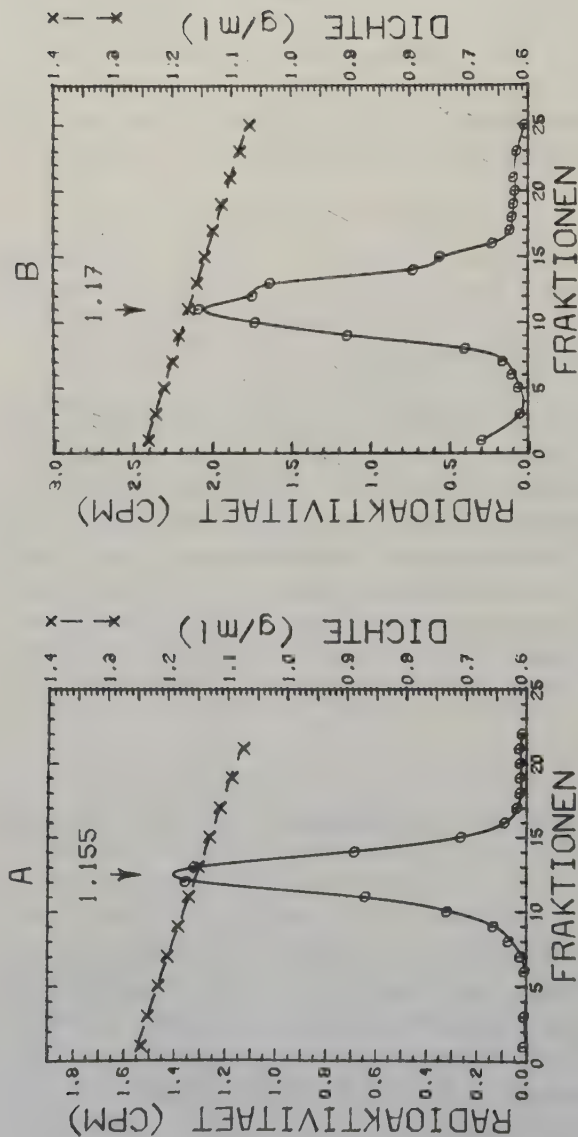


Abbildung 3: Analyse von RVE und RAV-0-Viren in 10 bis 50%igen Saccharosegradienten. Nach der Zentrifugation (vgl. 6.3) wurden die Röhren vom Boden in ca. 0,4 ml Fraktionen ausgetropft, von jeder zweiten Fraktion der Refraktionsindex (Berechnung der Dichte) bestimmt, und von jeder Fraktion ein Enzymtest auf Aktivität der Reversen Transkriptase durchgeführt. A) Retrovirale Elemente (angereichert aus $650 \mu\text{l}$ Ammoniumflüssigkeit), Enzymtest mit je $25 \mu\text{l}$ /Fraktion, cpm $\times 10^5$; B) RAV-0 (angereichert aus 600 ml Gewebekulturüberstand), Enzymtest mit je $5 \mu\text{l}$ /Fraktion, cpm $\times 10^3$;

bestimmt.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, weist das RVE-Enzym alle Eigenschaften der Reversen Transkriptase von RAV-0 auf: Beide Enzyme zeigen (analog zu den DNA-Polymerasen) eine DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität mit natürlicher DNA als Template und in einem etwas schwächerem Umfang mit dem synthetischen, homopolymeren DNA-Analog poly(dA). Beide sind jedoch - im Gegensatz zur DNA-Polymerase - in der Lage, sowohl die angebotenen synthetischen, homopolymeren RNA-Analoga als Template anzunehmen, wobei - wie erwartet - poly(rC) die bessere Matrize als poly(rA) ist. Ebenso vermögen sie heteropolymere RNA (AMV-RNA) zu transkribieren. Diese Aktivität ist auch zu ca. 50% in Gegenwart von Aktinomycin D nachweisbar. Aktinomycin D ist ein Inhibitor der DNA-Replikation. Somit kann der Einbau von Radioaktivität in säureunlösliches Material als Folge einer Kontamination der RVE-Probe mit DNA und DNA-Polymerase ausgeschlossen werden. Aktinomycin D interkalisiert ebenfalls in doppelsträngige RNA. Da einzelsträngige RNA aufgrund intermolekularer H-Brücken kurze Doppelstrangbereiche ausbilden kann, wird die Reverse Transkriptase in Gegenwart dieses Inhibitors zu circa 50% gehemmt.

Mit oligo(dG), also nur mit Primer und ohne Template, findet ein Einbau an Radioaktivität nur in der Probe mit Terminaler Transferase statt (101 000 cpm, Hintergrundswerte bei allen anderen Proben). Daher ist eine Kontamination der RVE-Probe mit Terminaler Transferase ebenfalls ausgeschlossen.

Mit diesen Experimenten ist das RVE-Enzym als Reverse Transkriptase identifiziert. Im nächsten Schritt mußte nun geprüft werden, ob die von den Hühnerembryonen in die Amnionflüssigkeit freigesetzten Partikel eine hochmolekulare RNA enthalten. Dieser Nachweis war von Bauer nicht geführt worden.

TABELLE 2: VERGLEICH DES RVE-PARTIKEL-ENZYMS MIT BEKANNTEN RNA- UND DNA ABHÄNGIGEN POLYMERASEN

	aktivier- te DNA	poly(dA) oligo(dT)	oligo dG	poly(rC) oligo(dG)	poly(rA) oligo(dT)	mRNA oligo(dT)	mRNA-oligo(dT) Aktinomycin D
RVE- Enzym	6000	2800	1000	114000	40000	13000	6100
RAV-O-Reverse Transkriptase	78000	12600	1600	2000000	550000	78000	47000
DNA-Poly- merase α	63200	20200	800	2300	1700	800	1300
Terminale Transferase	225000	119000	101000	75000	62000	30000	21000
H ₂ O	710	740	870	840	720	1100	1300

Um das RVE-Partikel eigene Enzym zu charakterisieren, wurden die Template/Primer Eigenschaften dieses Enzyms mit den Eigenschaften verschiedener bekannter Polymerasen verglichen. Die angegebenen Werte geben die gemessenen säurefällbaren cpm, d.h., die in hochmolekulare Nukleinsäure eingebauten dNMPs wieder. Nähere Erläuterungen siehe Text.

3.1.3 Enthalten die RVE der Hühner eine hochmolekulare RNA?

Wie in der Einleitung beschrieben, enthalten die Retroviralen Elemente der japanischen Wachtel und des Menschen eine hochmolekulare RNA (Mondal, H. et al., 1980, 1982, 1983). Daher lag die Vermutung nahe, daß auch in den Partikeln der Hühner mit der sehr sensitiven Methode des "simultanen Nachweistestes" RNA nachgewiesen werden kann.

Bei diesem Test wird die Struktur der Partikel durch ein Detergens (NP 40) zerstört, wodurch Enzym und Nukleinsäure freigesetzt werden. Gibt man dem Ansatz die 4 benötigten Desoxynukleotidtriphosphate und einen Primer (oligo dT) (Basenpaarung mit dem poly(A)-Ende der RNA) sowie die zur Enzymaktivität notwendigen Kationen zu, findet eine Synthese einer zur RNA komplementären DNA (cDNA) statt. Ist eines der Desoxynukleotide radioaktiv markiert, können nach Entfernung der Proteinbestandteile selbst äußerst geringe Mengen Reaktionsprodukt durch eine Zentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten analysiert werden (Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität). Da größere Nukleinsäuremoleküle bei der hochtourigen Zentrifugation schneller zum Boden sedimentieren als kleine, läßt sich zudem eine Aussage bezüglich der Größe des resultierenden DNA-RNA Hybrids machen.

Für den Test wurden nun folgende Ansätze vorbereitet, wobei Material der Fraktion mit der höchsten Enzymaktivität aus obigem Versuch (3.1) eingesetzt wurde (Fraktion 13):

Ansatz 1: 140 μ l Reaktionsmix + 60 μ l Probe

Ansatz 2: 140 μ l Reaktionsmix + 60 μ l Probe + RNase

Ansatz 3: 70 μ l Reaktionsmix + 30 μ l RAV-0-Probe

Alle Ansätze enthielten Aktinomycin D, das die Aktivität aller bekannten DNA abhängigen DNA-Polymerasen inhibiert (vergleiche oben). Um zusätzlich zu beweisen, daß die erwartete Radioaktivität auf eine cDNA-Synthese zurückgeführt werden kann, wurde im Ansatz 2 die Reaktion in Gegenwart von RNase (10 μ g/ml) durchgeführt. In diesem Fall sollte, ehe eine Synthese von cDNA stattfindet, die RNA zerstört werden, und deshalb an entsprechender Stelle im folgenden Dichtegradienten keine Radioaktivität nachweisbar sein. Als positive Kontrolle dienten wiederum RAV-0-Viren, die eine 70S-RNA (2x 35S RNA) sowie Reverse Transkriptase enthalten (Ansatz 3).

Nach der Reaktion (Einzelheiten siehe 5.6) wurden die Reaktionsprodukte von Proteinbestandteilen gereinigt, und in einem linearen Saccharosedichtegradienten analysiert.

Um eine Aussage über das Sedimentationsverhalten machen zu können, wurde zytoplasmatische RNA über einen weiteren Gradienten geschichtet und mit den anderen Proben zentrifugiert. Da der Anteil an ribosomaler 28S und 18S RNA ca.80% dieses RNA-Gemisches beträgt, können bei Prüfung der optischen Dichte nach der Zentrifugation pro Fraktion zwei deutliche Anstiege der Lichtabsorption beobachtet werden, die einer Ansammlung von 28S bzw. von 18S RNA entsprechen. Die Ergebnisse der 4 Gradienten sind in Abbildung 5 zusammengefaßt. Alle Gradienten waren in gleichgroße Portionen fraktioniert worden. Somit kann eine identische Dichte bei gleichen Fraktionen der verschiedenen Gradienten angenommen werden.

Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, findet man sowohl in der Probe mit RVE als auch in der Probe mit den RAV-0 einen Anstieg an säurefällbarer Radioaktivität in den Fraktionen

4-6, 10-12, und 17-18.

Daraus kann geschlossen werden, daß sowohl in der Probe mit RAV-0 als auch in der RVE-Partikel enthaltenden Probe eine cDNA-Synthese stattgefunden hat. Allerdings muß beachtet werden, daß die CPM-Werte der RVE-Probe nur den drei- bis vierfachen Wert des Hintergrundrauschens (10-20 CPM) betragen, was einen Einwand gegen die vorliegenden Ergebnisse zuläßt. In der RNase behandelten Probe konnten jedoch in keiner der Fraktionen 1 bis 30 mehr als 20 CPM gemessen werden. Somit liefern diese Daten einen deutlichen Hinweis auf das Vorhandensein einer hochmolekularen RNA in den RVE-Partikeln.

Die hohen CPM-Werte ab Fraktion 30 müssen auf eine unspezifische Adsorption von radioaktiv markierten Nukleotiden an die Nitrozellulosefilter zurückgeführt werden. Diese kleinen Moleküle dringen während der Zentrifugation nur wenig in den Dichtegradienten ein.

Die Daten deuten ferner darauf hin, daß die Präparation der Hühner RVE-Partikel keine größeren Verunreinigungen an unspezifischer RNA enthält, weil im Bereich der 28S und 18S RNAs keine Radioaktivität über den Hintergrundswerten gefunden wird.

Um diese Befunde zu bestätigen, wurden in einem weiteren Versuch aus der Amnionflüssigkeit von 200 Embryos wie oben beschrieben die Partikel über einen Saccharosegradienten gereinigt, aus den Fraktionen mit Enzymaktivität die Nukleinsäuren extrahiert (6.7) und diese mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Um ausschließen zu können, daß es sich bei der Beobachtung einer Nukleinsäurebande im Gel um DNA handelt, wurde die Hälfte der RVE-Probe mit RNase (DNase frei) behandelt.

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, kann nach der Gele-

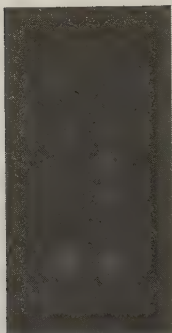


Abbildung 4: Minigelelektrophorese der Nukleinsäuren aus der Partikelfraktion; a) AMV-RNA; b) RVE-RNA c) ribosomale RNA d) RVE-RNA nach RNase Verdau; Nähere Erläuterung siehe Text.

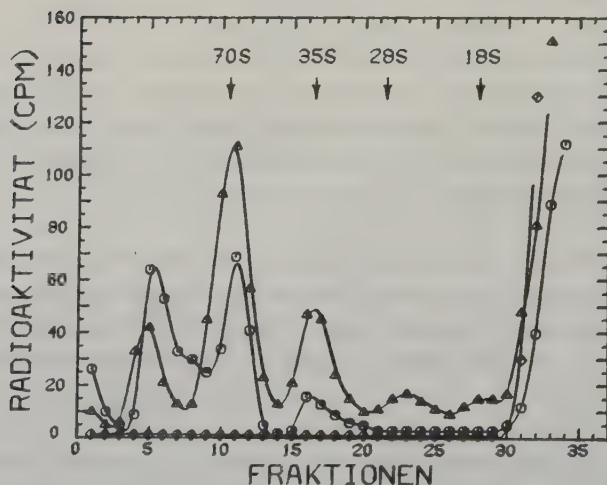


Abbildung 5: Analyse der Reaktionsprodukte des simultanen Nachweistestes in einem 10-30%igen Saccharosedichtegradienten: Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen vom Boden in ca. 0,3 ml Fraktionen ausgetropft und von jeder Fraktion die säurefällbare Radioaktivität ermittelt. o—o = RVE-Partikel ohne RNase; $\diamond$ — $\diamond$ = RVE-Partikel + RNase; Δ -- Δ = Probe mit RAV-0. Bei der graphischen Darstellung wurde von allen CPM-Werten der Wert des Hintergrundrauschens (20 CPM) subtrahiert. Nähere Erläuterung siehe Text.

elektrophorese bei einer Position von ca. 50S eine Bande beobachtet werden (Schlot b), die im Schlot mit dem RNase behandeltem Ansatz (Schlot d) nicht auftritt. Schlot a zeigt AMV-RNA (70S), Schlot c ribosomale RNA (28 und 18S) zum Größenvergleich.

Aufgrund der Ergebnisse des simultanen Nachweistestes und der Elektrophorese ist sichergestellt, daß die Retroviralen Elemente sowohl Reverse Transkriptase als auch eine hochmolekulare RNA enthalten. Obwohl die Daten bezüglich der Größe der RVE-RNA (70S gemäß des simultanen Nachweistests, 50S nach Gelelektrophorese) im Widerspruch stehen, kann davon ausgegangen werden, daß die untersuchte RNA eine Größe von 50S besitzt, weil die Gelelektrophorese die genauere Methode zur Molekulargewichtsbestimmung darstellt. Der hohe Sedimentationswert im Sucrosegradienten muß auf Aggregatbildungen der RNA (Wasserstoffbrückenbildungen zwischen den RNA-Molekülen) zurückgeführt werden.

Da sich die cDNA-Synthese mit oligo(dT) initiieren ließ, kann auch davon ausgegangen werden, daß die RNA am 3'Ende einen polyA-Tail enthält.

3.1.4 Ist die RVE-RNA mit der RNA von RAV-0 verwandt?

Ehe mit Klonierungsexperimenten begonnen werden konnte, mußte durch Hybridisierungsexperimente sichergestellt werden, daß es sich bei der RVE-RNA um eine von der RAV-0-RNA verschiedene Nukleinsäure handelt. Die RNA von RAV-0 ist nämlich bereits kloniert und eingehend untersucht worden (Coffin et al., 1977, Neiman et al., 1977, Coffin und Haseltine, 1977 S. Hughes, 1982).

Für den Versuch wurden aus weiteren 500 Hühnerembryos die

RVE-RNA wie oben beschrieben gereinigt. Für die cDNA-Synthese wurde die Hälfte der RVE-RNA sowie 1 µg RAV-0-RNA eingesetzt (Siehe 6.10.1). Bei Verwendung von oligo(dT) als Primer entspricht der größte Anteil der cDNA dem 3'-Ende der RNA, wodurch Verfälschungen der Hybridisierungsergebnisse auftreten. Deshalb wurden 10 bis 20 bp lange einzelsträngige Kalbsthymus-DNA Fragmente als Primer verwendet, die statistisch über das gesamte Genom an die RNA hybridisieren können und somit eine gleichmäßige Transkription aller Regionen der RNA gewährleistet.

Die spezifische Radioaktivität der Nukleotidtriphosphate (Ci/mmol, vom Hersteller angegeben), die bekannte Zählausbeute (cpm/µCi im Zähler) und die Annahme, alle 4 Basen seien in gleicher Menge in der RNA enthalten, ermöglichen aus der Radioaktivitätsmenge (cpm) der cDNA die Berechnung der Menge (ng) an cDNA (Vergleiche 6.10.1).

Im Falle der RAV-0-RNA konnte nach Verdau der RNA durch Alkali und anschließender Neutralisation eine Ausbeute von ca. 100 ng cDNA ermittelt werden. Dies bedeutet, daß ca. 10% der RNA in cDNA transkribiert wurden. Unter der Annahme, daß die Ausbeute an RVE-cDNA dem gleichen prozentualen Anteil entspricht, kann die Menge der isolierten RVE-RNA ermittelt werden. Nach diesen Berechnungen beträgt diese nur 100 bis 200 ng RNA aus der Amnionflüssigkeit von 500 Hühnerembryos!

Für die Hybridisierung wurden nun folgende Proben vorbereitet:

1. bis 4. 2500 cpm (3,5ng) RAV-0-cDNA (Leerwert)
5. + 6. 2500 cpm RVE-cDNA + 50 ng RVE-RNA
7. + 8. 2500 cpm RAV-0-cDNA + 50 ng AMV-RNA
9. + 10. 2500 cpm RAV-0-cDNA + 50 ng RAV-0-RNA
(positive Kontrolle)
11. bis 14. 2500 cpm RVE-cDNA (Leerwerte)

15. + 16. 2500 cpm RVE-cDNA + 50 ng RAV-0-RNA
 17. + 18. 2500 cpm RVE-cDNA + 50 ng AMV-RNA

Die Hybridisierung der RAV-0-cDNA mit AMV-RNA diente als positive Kontrolle. Diese hybridisiert zu circa 70% (Wright und Neiman 1974, Hayward und Hanafusa 1975, Shoyab und Baluda 1976) mit der RAV-0-cDNA. Die Hybridisierung fand bei 65°C für 24 Stunden statt ($Cot = 0,5$). Danach wurden alle Ansätze (Ausnahme: 3, 4, 13 und 14) für 90 Minuten mit S1-Endonuklease verdaut, um die nicht hybridisierten einzelsträngigen Nukleinsäuren zu hydrolysieren. Tabelle 3 faßt die ermittelte säurefällbare Radioaktivität und die berechneten Homologien zusammen.

TABELLE 3: Ermittlung der verwandtschaftlichen Beziehungen der RAV-0-RNA (endogener Hühnervirus und AMV-RNA (exogener Hühnervirus) mit der RVE-RNA.

Proben	cDNA / RNA	S1	cpm	%Hyb
1 + 2	RAV-0-cDNA	+	270	-
3 + 4	RAV-0-cDNA	-	2250	-
5 + 6	RAV-0-cDNA + RVE-RNA	+	680	18
7 + 8	RAV-0-cDNA + AMV-RNA	+	1665	62
9 + 10	RAV-0-cDNA + RAV-0-RNA	+	2050	79
11 + 12	RVE-cDNA	+	250	-
13 + 14	RVE-cDNA	-	2040	-
15 + 16	RVE-cDNA + RAV-0-RNA	+	490	12
17 + 18	RVE-cDNA + AMV-RNA	+	650	20

S1: Zugabe von S1-Endonuklease nach der Hybridisierung (siehe Methoden); die angegebenen cpm-Werte geben den Mittelwert der beiden Proben wieder; Nähere Erläuterung

siehe Text.

Daraus ist ersichtlich, daß die RVE-RNA zu circa 10% bis 20% mit der AMV- bzw. RAV-0-cDNA hybridisiert - und umgekehrt - und daher nicht mit diesen identisch ist. Das Resultat dieses Experiments zeigt - wie erwartet - eine circa 60%ige Homologie der AMV-RNA mit der RAV-0-cDNA. Somit kann der Befund der geringen Verwandtschaft der RVE-RNA mit den retroviralen RNAs als Folge ungeeigneter Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

3.2 Standardisierung der molekularen Klonierung

Für die molekulare Klonierung von Genen in bakteriellen Plasmiden stehen mehrere Methoden zur Verfügung (Efstratiadis, A. und Villa-Komaroff, L. 1979, Rabbits, T.H. 1976, Rougeon, F et al. 1975, Wood, K.O. und Lee, J.C. 1976). Ein Versuch, mit der herkömmlichen Methode in pBR322 zu klonieren, verlief jedoch - vermutlich wegen der äußerst geringen Menge an cDNA - erfolglos. Deshalb zog ich die Methode von Okayama und Berg (Okayama, H. und Berg, P. 1982) heran. Die Strategie dieser Klonierungsprozedur ist in Abbildung 6 dargestellt und erläutert. Wie daraus zu entnehmen ist, sind hierzu ein spezieller Klonierungsvektor und ein DNA-Linkermolekül notwendig, welche damals nicht käuflich erhältlich waren. Deshalb mußten zunächst zur Herstellung dieser DNAs sowohl das Vektor- als auch das Linkerplasmid konstruiert werden (Siehe unten).

3.2.1 Konstruktion des Vektorplasids

Das von Okayama und Berg eingeführte Klonierungsplasmid ist ein Derivat von pBR322 und enthält ein Fragment des Affenvirus SV40. Die damit eingeführten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Kpn I und Hpa I weist das herkömmliche Plasmid pBR 322 nicht auf. Sie sind jedoch für die Methode von großer Bedeutung (vergleiche unten).

Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, resultieren aus einem Verdau der SV40-DNA mit den Restriktionsenzymen Hind III und Pvu II 9 Fragmente, wovon 5 im Plasmid pBR 322 klonierbar

CLONING OF mRNA

32

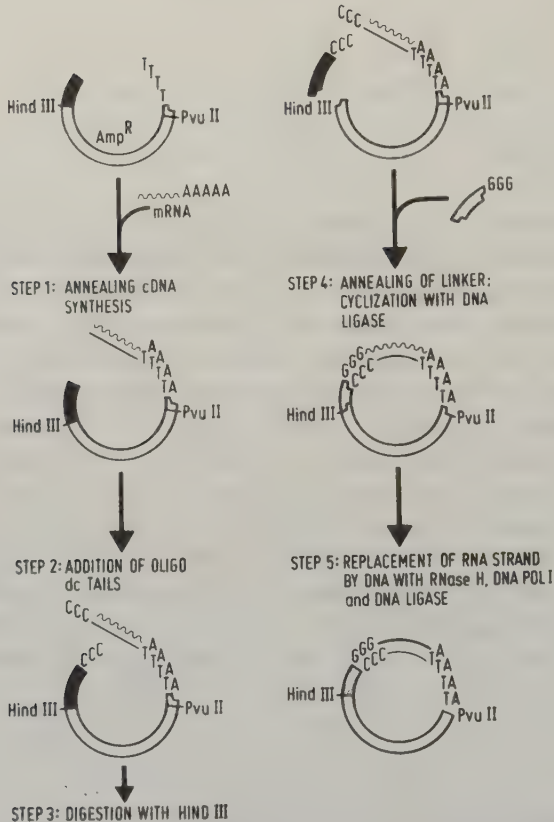


Abbildung 6: Übersicht über die einzelnen Schritte der molekularen Klonierung einer RNA in einem bakteriellen Plasmid nach Okayama und Berg: (1) An den oligo dT-Tail des linearisierten Vektors wird das polyA-Ende der RNA hybridisiert, und anschließend die cDNA Synthese durchgeführt. (2): Die 3'-OH-Enden werden nun mit Hilfe der Terminalen Transferase mit einem poly dC-Tail versehen, der vom Vektorende mit einem Stück Vektor-DNA durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Hind III (3) entfernt werden kann. Durch Zugabe eines geeigneten Linkers wird in nächsten Schritt (4) das Molekül zirkularisiert und gleichzeitig ein Primer für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges zur Verfügung gestellt (5).

KONSTRUKTION DES VEKTORPLASMIDS

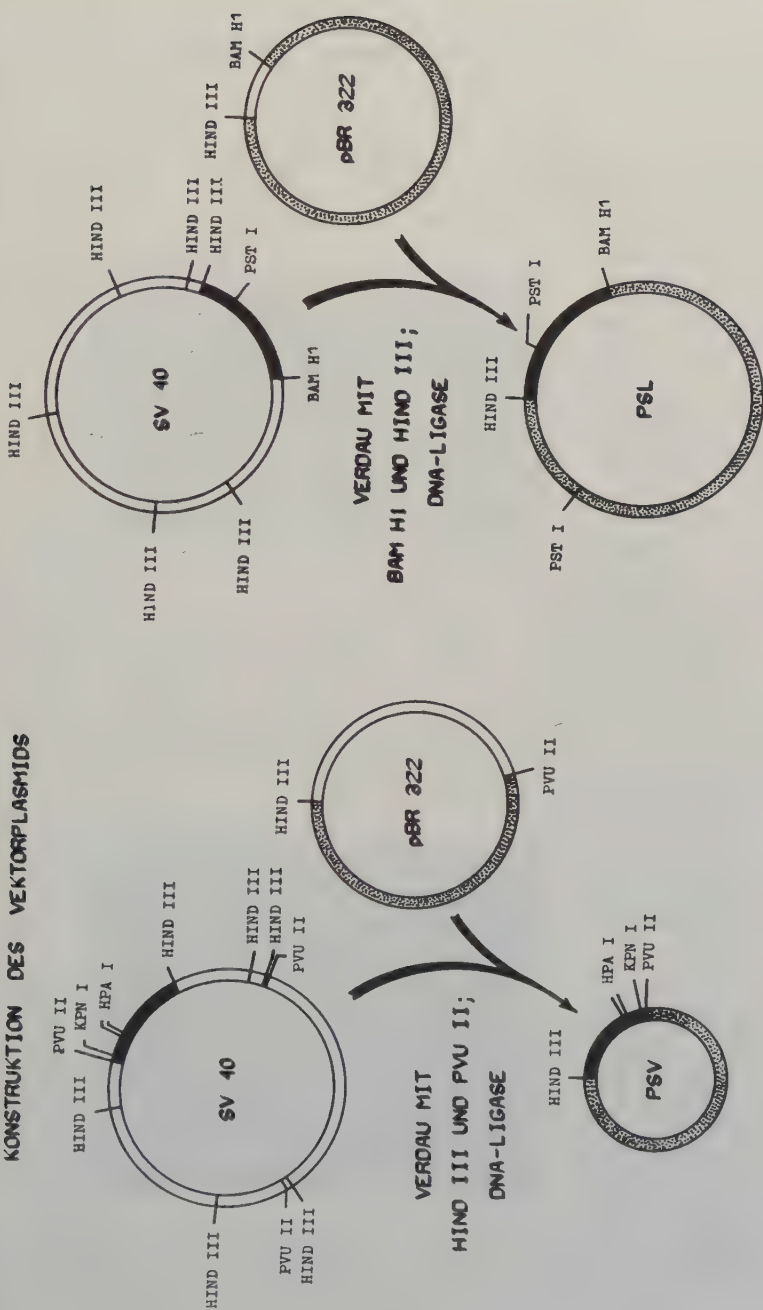


Abb. 7
Im Plasmid pBR 322 wird das HindIII-PvuII Fragment durch ein HindIII-PvuII Fragment des Affenvirus SV 40 substituiert, das Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme KpnI und HpaI enthält

Abb. 8
Im Plasmid pBR 322 wird das HindIII-BamHI Fragment durch ein HindIII-BamHI Fragment von SV 40 ersetzt, aus dem das für die Klonierung (Abb.6) notwendige Linkermolekül hergestellt wird.

sind, das ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten worden ist.

Für das Experiment wurden je 0,35 pmol pBR 322 und SV40-DNA im äquimolaren Verhältnis gemischt, mit den genannten Enzymen verdaut und nach der Ligasereaktion (6.10.5) nochmals mit dem Enzym Bam H1 verdaut. Dadurch können rekonstituierte pBR 322-Moleküle sowie Plasmide linearisiert werden, die das größte SV40-Fragment enthalten. Da lineare Plasmide von Bakterien nicht repliziert werden können, wird durch diese Prozedur die Anzahl der möglichen Rekombinanten reduziert, wodurch das "Fischen" nach dem gewünschten Klon vereinfacht wird.

Die Transformation der Bakterien (vgl. 6.17) wurde mit dem gesamten Ansatz durchgeführt und die Bakterien auf Ampizillin enthaltende Platten ausplattiert. Von den ca. 400 Transformanten erwiesen sich alle als Tetracyclin sensitiv, wobei 2 der 24 näher untersuchten Kolonien (DNA-Präparation nach Birnboim, Methode siehe 5.12, Daten nicht gezeigt) das gewünschte Vektorplasmid enthielten. Abbildung 9 zeigt die gereinigte Plasmid-DNA eines Klons, die im folgenden PSV (pBR-SV40-Vektor) genannt wird.

3.2.2 Konstruktion des Linkerplasmids

Die Strategie der Konstruktion des Linkerplasmids ist in Abbildung 8 dargestellt. Im Experiment wurden wiederum 0,35 pmol pBR322 mit SV40 DNA im äquimolarem Verhältnis gemischt, mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam H1 verdaut und die resultierenden Fragmente mit T4-Ligase ligiert. Bei der anschließenden Transformation konnten zwar nur 8 Kolonien gezählt werden, doch enthielten zwei Klone das gewünschte Linkerplasmid, das die zur Herstellung des Linkers

a b c d e f

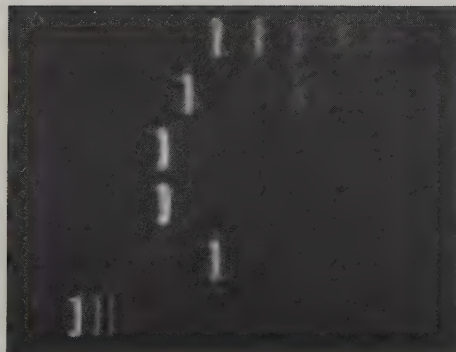


Abb. 9

Gelelektrophorese des gereinigten Vektor Plasmids. a) Hind III verdaute λ -DNA; b) ungeschnittene Plasmid DNA; c) PSV mit Kpn I verdaute; d) PSV mit Hpa I geschnitten; e) PSV-Verdau mit Hind III und Pvu II; f) SV40-DNA mit Hind III und Pvu II geschnitten;

a b c d e

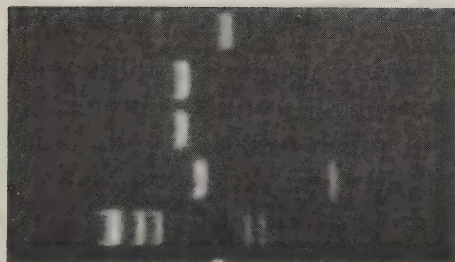


Abb. 10

Gelelektrophorese des gereinigten Lin-ker Plasmids. a) Hind III verdaute λ -DNA; b) PSL mit Pst I verdaute; c) PSL mit Hind III verdaute; d) PSL mit BamH I verdaute; e) ungeschnittenes Plasmid

notwendigen Restriktionsenzymschnittstellen enthält (Analyse nach Birnboim, Methode siehe 6.12, Daten nicht gezeigt). Abbildung 10 zeigt das gereingte Plasmid eines Klons in der Agarosegelelektrophorese, das im folgenden mit PSL (pBR322-SV40-Linker) bezeichnet wird.

3.2.3 Herstellung des T-getailten Vektors

In Abbildung 11 ist die Strategie der Herstellung des "Vektorprimers" gezeigt. Um diesen effektiv einsetzen zu können, ist es notwendig, ihn von dem kleinen aus der Präparation resultierenden, ebenfalls T-getailten DNA-Fragment zu trennen. DNA-Fragmentreinigungen werden fast ausschließlich via Gelelektrophorese durchgeführt, wobei nach Färben des Gels mit Ethidiumbromid ein Gelstück mit dem gewünschten Fragment ausgeschnitten wird. Die Elution der DNA erfolgt wiederum elektrophoretisch in einem Dialyseschlauch.

Meist enthält jedoch die so gereinigte DNA einen erheblichen Anteil an Agaroseverunreinigungen, die nachfolgende Enzymreaktionen dämpfen oder sogar völlig inhibieren können. Nachdem erste Klonierungsversuche mit gelelektrophoretisch gereinigten Vektor und Linker-DNAs - vermutlich aus diesen Gründen - negativ verliefen, wurde versucht, diese DNAs mit Hilfe der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) zu reinigen.

Von Graeve und Krupa (Graeve et al. 1982) war erstmals gezeigt worden, daß RNA-Moleküle unterschiedlicher Größe mit HPLC-Säulen erfolgreich getrennt werden können. Eine gereinigte Globin-mRNA erwies sich nach der Trennung als biologisch aktiv (Graeve et al. 1983). Eine japanische Arbeitsgruppe hatte von der Trennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der HPLC berichtet (Kato et al. 1983), und von der

PLASMID PRIMER

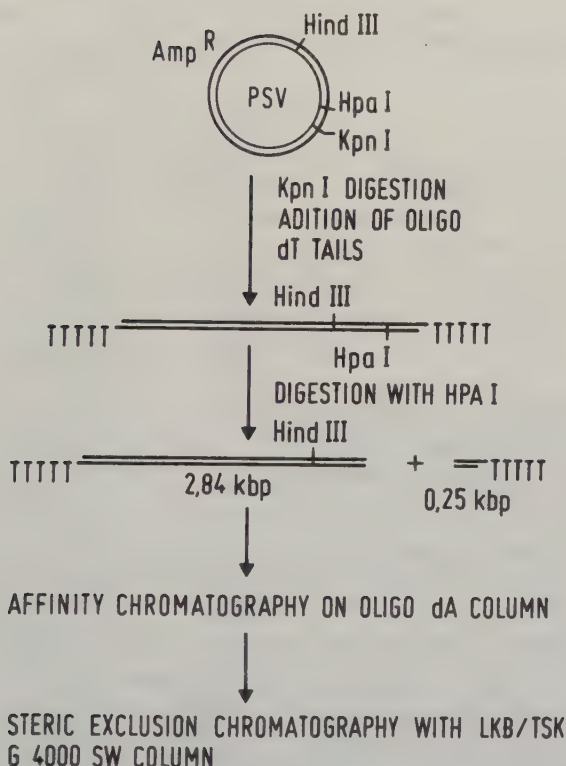
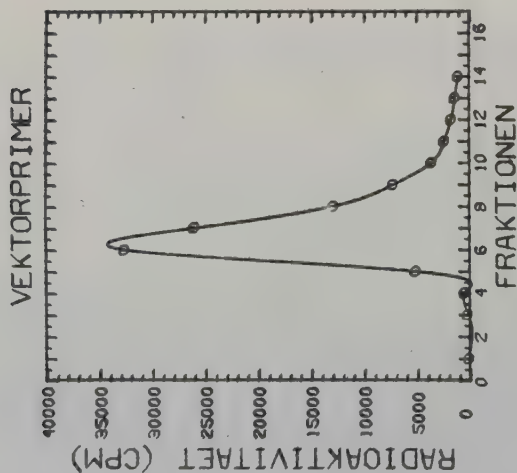


Abbildung 11: Übersicht über die Herstellungsprozedur des T-getailten Vektorprimers: Die PSV-Moleküle werden mit dem Restriktionsenzym Kpn I linearisiert und an die freien 3'OH-Enden mit terminaler Transferase 60 bis 80 dT Residuen angehängt. Nach Schneiden der getailten DNA mit Hpa I wird der 2,84 kbp Vektorprimer nach Affinitätschromatographie über eine oligo(dA)-Säule (vgl. Abb. 12a) mit Hilfe der HPLC von dem kleinen DNA-Fragment gereinigt (Einzelheiten der Reaktionsbedingungen siehe Methoden).

a.)



b.)

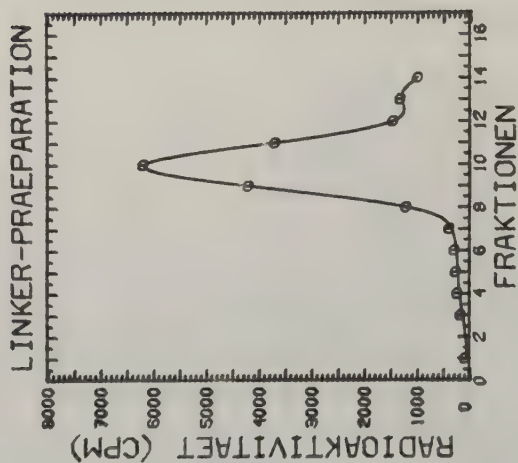


Abbildung 12: Affinitätschromatographie der geteilten Vektor- und Linkermoleküle: a) Elutionsprofil des T-geteilten Vektorprimers über eine oligo(dA)-Säule; b) Elutionsprofil der G-geteilten Linkerpreparation über eine oligo(dC)-Säule. Das Effluent wurde in ca. 100 μ l großen Fraktionen gesammelt und von 5 μ l jeder Fraktion die Radioaktivität in Aquasol bestimmt. Einzelheiten der Prozedur siehe Methoden.

Firma LKB lag ein Anwendungsbeispiel von DNA-Fragmenttrennungen mit einer TSK-G-4000 SW Säule vor. Gemäß dieser Veröffentlichungen können DNA-Fragmente bis zu einer Größe von ca. 450 bp mittels dieser Säule (sterische Ausschlusschromatographie) mit einem hohen Auflösungsvermögen getrennt werden, während größere Fragmente im Ausschlussvolumen der Säule eluieren.

Für die Klonierung mußten der 2800 bp Vektorprimer von einem 200 bp Fragment sowie das 280 bp Linkermolekül von 780 und 3800 bp DNA-Bruchstücken gereinigt werden (vergleiche Abbildung 11 und 14). Die durchzuführenden Trennungen der Vektor- und Linker-DNAs sollten also mit einer TSK G 4000 SW Säule möglich sein. Deshalb wurden die folgenden Versuche mit dieser Säule durchgeführt.

Im Experiment wurden 200 µg PSV mit Kpn I linearisiert, an die freien 3'OH-Enden 60 bis 80 dT-Residuen angehängt und die DNA mit Hpa I geschnitten (vergleiche Abbildung 11). Eine Affinitätschromatographie über eine oligo (dA) Säule (Siehe Abbildung 12a) diente dazu, unverdaute sowie ungeteilte Plasmidmoleküle zu entfernen.

Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil der HPLC-Chromatographie der Vektorpräparation. Wie erwartet können zwei Peaks beobachtet werden, die eine vollständige Trennung der beiden DNA-Fragmente widerspiegeln. Eine gelelektrophoretische Untersuchung von Aliquots der beiden vereinigten Peakfraktionen bestätigt dieses Ergebnis (Siehe Abbildung 13, Insert).

Versuche mit verschiedenen großen Mengen an DNA hatten ergeben, daß das Maximum der Säulenkapazität der TSK G 4000 SW-Säule bei 20 µg Ausgangs-DNA liegt (Daten nicht gezeigt). Bei größeren Mengen überlappen beide Peaks beträchtlich, wobei es zu einer Durchmischung der beiden Fragmente kommt. Auch spielt das Injektionsvolumen der Probe für die Qualität

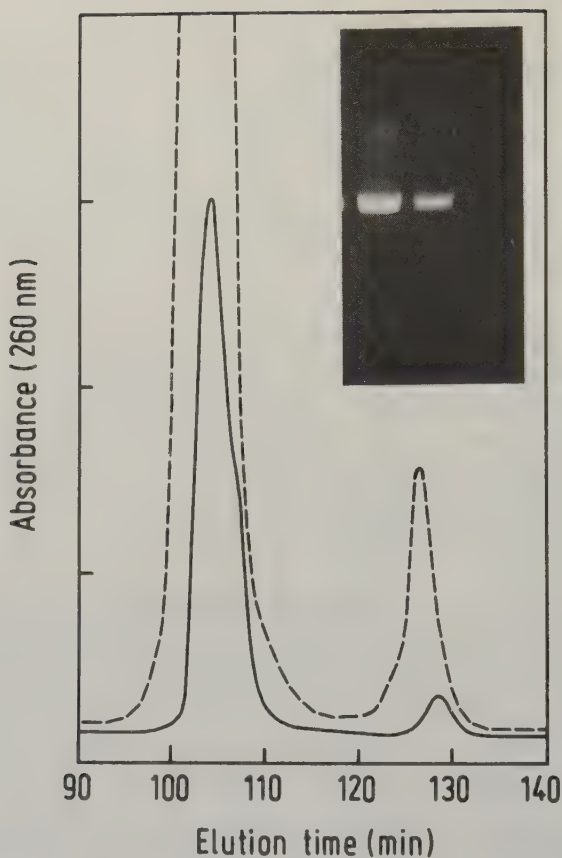


Abbildung 13: Elutionsprofil der TSK G 4000 SW Säulenchromatographie: 7 μg Vektorprimer wurden in 7 μl Wasser gelöst und auf die Säule aufgetragen (Bedingungen der Elution siehe 6.17). Insert rechts oben: Aliquots der Elutionspeaks, von links nach rechts: Material vor der Chromatographie, ca. 0,5 μg DNA des ersten Peaks, ca. 100 ng des zweiten Peaks. Weitere Erklärungen siehe Text.

TABELLE 4

EFFEKT DER REINIGUNGSMETHODE DES VEKTORPRIMERS AUF DIE cDNA SYNTHESE

	% cDNA Transkription
AMV-RNA mit gelelektrophoretisch eluiertem PSV Primer	0,5 - 1 %
AMV-RNA mit HPLC gereinigtem PSV Primer	4 - 7 %
AMV-RNA mit synthetischem oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	4 - 7 %

Mit geleleuiertem sowie HPLC gereinigtem PSV Primer wurden cDNA Experimente durchgeführt, um den Effekt der Reinigungsmethode auf die Ausbeute an cDNA zu bestimmen. Die ermittelten %-Werte beziehen sich auf ng cDNA pro μ g AMV-RNA.

der Trennung eine entscheidende Rolle. Es sollte so gering wie möglich sein (max. 10 μ l), um eine vollständige Trennung zu gewährleisten.

Um die biologische Aktivität des HPLC gereinigten Vektorprimers zu überprüfen, wurden zunächst cDNA-Experimente mit AMV-RNA durchgeführt. Wie aus Tabelle 4 entnommen werden kann, erweist sich der HPLC gereinigte Vektor als Primer um einen Faktor 5 bis 10 besser als die aus dem Agarosegel elektrophoretisch eluierte DNA. Es wurden somit Ausbeuten erzielt, wie sie mit dem synthetischen Oligonukleotidprimer dT₁₂₋₁₈ erhalten werden.

Dieser Befund bestätigt die Annahme, daß durch die Elution aus dem Agarosegel Verunreinigungen in die DNA-Probe eingeschleppt werden, die in diesem Falle die Aktivität der Reversen Transkriptase deutlich dämpfen.

3.2.4 Herstellung des G-getailten Linkers

Abbildung 14 gibt einen Überblick über die Strategie der Präparation des G-getailten Linkers. Im Versuch wurden 200 μ g PSL mit Pst I linearisiert, an die freien 3'OH-Enden 10 bis 15 (dG)-Residuen angehängt und die DNA mit Hind III geschnitten. Durch Messung der Radioaktivität war sichergestellt worden, daß die geeignete Anzahl an (dG)-Residuen an das 3'OH-Ende angehängt worden war (Berechnung siehe Methoden 6.10.3). Die Affinitätschromatographie (Abbildung 12b) über eine oligo(dC)-Säule diente wiederum zur Entfernung von ungeschnittenen und unzureichend getailten DNA-Molekülen.

Nach meinen Erfahrungen binden je nach Qualität der Präparation maximal 50% der Nukleinsäuren an die Säule. Dieser Befund kann damit erklärt werden, daß lange (dG)-Einzelstränge intramolekulare Strukturen ausbilden, die

OLIGO dG-TAILED LINKER DNA

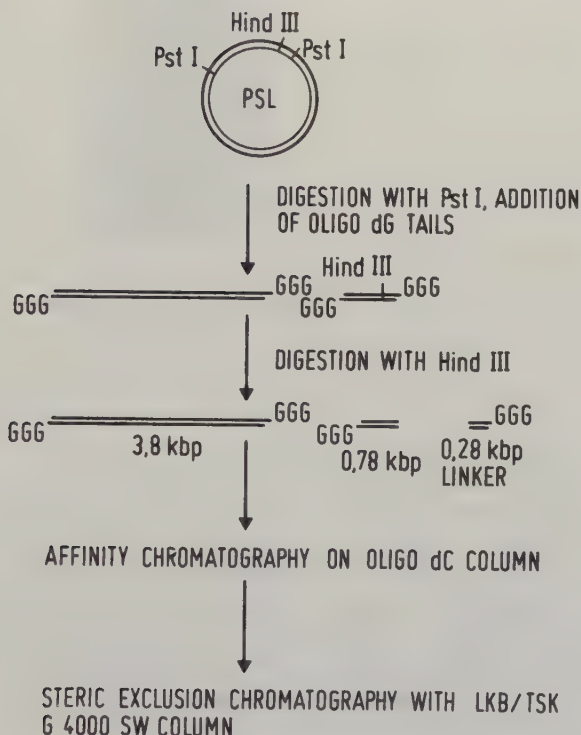


Abbildung 14: Übersicht über die Herstellungsprozedur des G-getailten Linkers: Die PSL-Moleküle werden mit dem Restriktionsenzym Pst I geschnitten und an die freien 3'OH-Enden mit Terminaler Transferase 10 bis 15 (dG)-Residuen angehängt. Nach Schneiden der DNA mit Hind III und nach Affinitätschromatographie über eine oligo(dC)-Säule (vgl. Abb. 12b) kann das Linkerfragment mit Hilfe der HPLC von den anderen DNA-Fragmenten abgetrennt werden (Einzelheiten der Reaktionsbedingungen siehe Methoden).

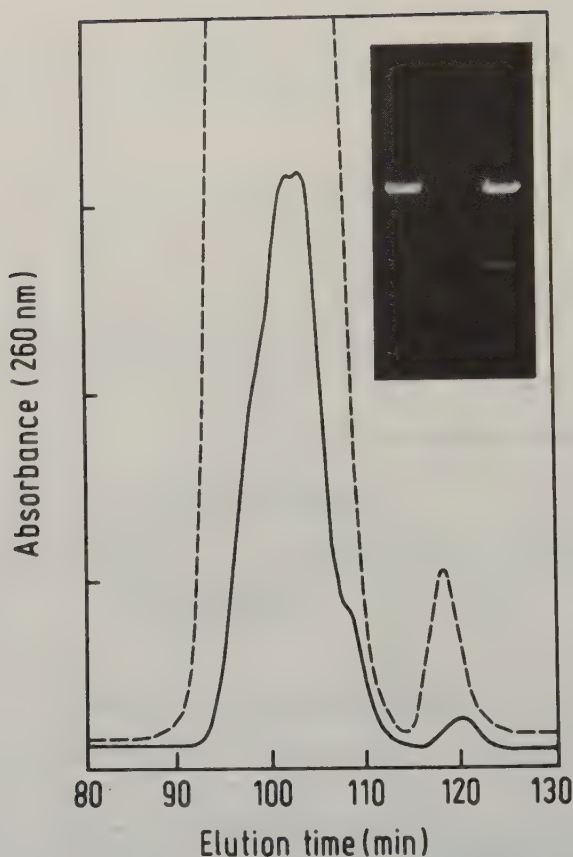


Abbildung 15: Elutionsprofil der TSK G 4000 SW Säulenchromatographie: 20 μ g der G-getailten DNA wurden in 10 μ l Wasser gelöst und auf die Säule aufgetragen (Bedingungen der Elution siehe 6.17). Insert rechts oben: Agarosegelelektrophorese von Aliquots der beiden Peaks; von links nach rechts: Material des ersten Peaks, Material des zweiten Peaks (Linker), Ausgangsmaterial vor der Chromatographie.

nicht mit dem oligo(dC) basenpaaren können, während zu kurze Tails aufgrund zu weniger H-Brücken instabile Hybride formen.

Diese Affinitätschromatographie hat sich zudem als essentiell erwiesen, da ungeschnittene, extrem verknäulte Linkerplasmidmoleküle zusammen mit dem 280 bp großem Linker bei der anschließenden sterischen Ausschlußchromatographie eluieren. Das Auflösungsvermögen der sterischen Ausschlußchromatographie ist durch das hydrodynamische Volumen der zu trennenden Substanzen bestimmt. Dies erklärt den zunächst überraschenden Befund der gemeinsamen Elution des 280 bp Linkers mit dem stark verknäulten ungeschnittenem 5000 bp Plasmid. In meinen Experimenten trugen ohne vorangegangene Affinitätschromatographie mehr als 50% der Transformanten PSL-Plasmide!

Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil der Chromatographie der Linkerpräparation. Wie erwartet können zwei Peaks beobachtet werden, die eine Trennung des Linkers von den beiden anderen im Ausschlußvolumen der Säule eluierenden DNA-Moleküle widerspiegeln. Eine gelelektrophoretische Überprüfung bestätigt die erfolgreiche Trennung und die Reinheit der Linkerpräparation (Abbildung 15, Insert).

3.2.5 Klonierung von AMV-RNA

Für die Standardisierung der Klonierungsmethode eignete sich wiederum AMV-RNA, welche eine der RVE-RNA entsprechende Größe besitzt. Die Klonierungsprozedur wurde ohne Modifikationen streng nach den Angaben von Okayama und Berg (Okayama und Berg, 1982) durchgeführt. Nachdem zur molekularen Klonierung der RVE-RNA nur ng Mengen an RNA zur Verfügung standen, erschien es sinnvoll, die Klonierungsmethode mit verschiedenen Mengen AMV-RNA zu prüfen.

Im Verlauf der Klonierungsprozedur müssen die Nukleinsäuren mehrere Male durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation von Enzymen vorangegangener Reaktionen gereinigt werden. Kleine DNA-Mengen lassen sich jedoch nur schlecht mit Alkohol fällen. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen bei unterschiedlicher RNA-Menge jeweils 1 μg Vektorprimer eingesetzt (=Carrier zur Ethanolfällung), um diesen unerwünschten Effekt zu vermeiden.

Die Standardisierung der Methode erfolgte mit 1 μg , 0,5 μg und 0,1 μg AMV-RNA. Zur Ermittlung der biologischen Aktivität der HPLC gereinigten DNAs wurde in einem weiteren Versuch der T-Tails des Vektors mit einem kurzen C-Tail verlängert und das Plasmid mit dem Linker geschlossen. Damit sollte überprüft werden, ob im Falle einer geringen Ausbeute von transformierten Bakterien der Fehlschlag die Folge biologisch inaktiver Nukleinsäuren darstellt.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Daraus ist zunächst ersichtlich, daß ohne cDNA-Synthese mit den HPLC gereinigten Nukleinsäuren eine sehr hohe Ausbeute an Transformanten erzielt werden kann (30000 Kolonien pro μg Vektor-DNA).

Die niedrigere Effizienz bei Zugabe von RNA und cDNA-Synthese hat verschiedene Gründe. 1) Bei der AMV-RNA handelt es sich um eine sehr lange RNA. Daher ist der überwiegende Teil der cDNAs wesentlich kürzer als die RNA. Die Folge davon sind DNA-RNA Hybride mit einem überhängenden 5' Ende der RNA; d.h. das 3'OH-Ende der cDNA ist "maskiert" und stellt für die Terminale Transferase ein schlechteres Substrat dar als freie unblockierte 3' Enden. 2) Die Zugabe von poly(rA) (vgl. Okayama und Berg, 1982) verhindert, daß freie 3'Enden von Vektormolekülen (ohne RNA-Hybrid) bevorzugt mit einem C-Tail versehen werden. 3) Die cDNA-Synthese erfordert einen Reinigungsschritt mehr, bei dem ein Verlust von Material eintritt.

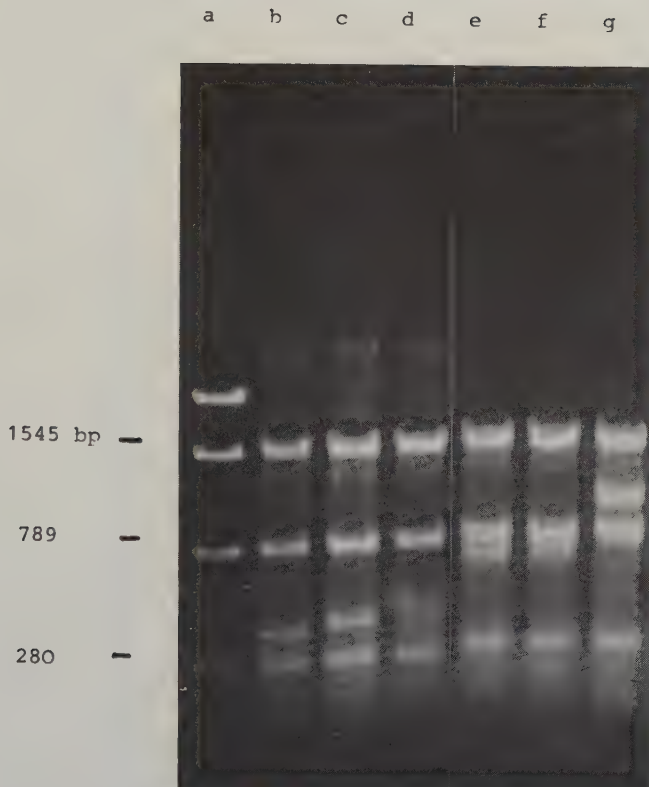


Abbildung 16: ³²P-Agarosegelelektrophorese einiger AMV-cDNA Klone, die mit ³²P-markierter AMV-cDNA in der Koloniehybridisierung ein positives Signal gaben. a) mit Pst I und Pvu II geschnittenes PSL-Plasmid (Marker); b - g AMV-cDNA Klone ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut; Die Plasmide wurden nach Birnboim isoliert (siehe Methoden 6.12) und die RNA mit RNase vor der Elektrophorese verdaut.

TABELLE 5

EFFEKT DER REINIGUNGSMETHODE VON VEKTOR UND LINKER-DNA AUF DIE AUSBEUTE REKOMBINANTER DNA

Vektorprimer	Menge AMV-RNA	molares Verhältnis Vektor:RNA	Anzahl der Trans- formanten// μ g Vektor	Anzahl der Insert- pos. Klone / 100
HPLC gereinigter Vektor und Linker				
1 μ g	--*	-	30 000	-
1 μ g	1 μ g	1 : 1	12 000	30
1 μ g	0,5 μ g	2 : 1	12 000	30
1 μ g	0,1 μ g	10 : 1	11 000	1-3
gelelektrophoretisch gereinigter Vektor und Linker				
1 μ g	1 μ g	1 : 1	50	-

Um die Ausbeute an cdNA-Klonen zu bestimmen, wurden Klonierungsexperimente mit HPLC sowie gelelektrophoretisch eluierten Vektor und Linker DNAs durchgeführt. *) Hier wurde der Vektor ohne Zugabe von RNA nach Verlängerung des T-Tails (vgl. Abb. Klonierungsstrategie) mit 10-15 dC mit dem Linker zirkularisiert, um die maximal zu erwartende Effizienz der Klonierungsprozedur zu ermitteln.

Die Ausbeute an Insert positiven Kolonien wurde mit der Koloniehybridisierungsmethode (6.17) mit je 100 Kolonien bestimmt. Zur Kontrolle wurden einige der mit dieser Methode als positiv eingeschätzten Klone mit der Methode von Birnboim auf Inserts untersucht (Vgl. Abbildung 16).

Wie aus Tabelle 5 weiter ersichtlich ist, hängt die Anzahl der Insert-positiven Klone in beträchtlichem Maße von der Menge an RNA ab. Die Standardisierung der Methode hat weiterhin gezeigt, daß - wie vermutet - Agaroseverunreinigungen Ursache der negativen Resultate mit gelelektrophoretisch gereinigten Nukleinsäuren sind, weil mit diesen DNAs kein positives Resultat erzielt werden konnte.

3.3 Molekulare Klonierung und Charakterisierung der RVE-RNA

Die Klonierungsexperimente mit AMV-RNA hatten gezeigt, daß ng Mengen an hochmolekularer RNA mit der beschriebenen Methode als cDNA-Fragmente klonierbar sind. Obwohl die Ausbeute an insertpositiven Klonen mit 100 ng RNA sehr gering war (ca. 1-3%), erschien sie dennoch ausreichend, um zumindest cDNA-Bruchstücke der RVE-RNA in Bakterien amplifizieren zu können, und damit eine Probe in ausreichender Menge für weitere Untersuchungen zu erhalten.

Nach dem Ausplattieren der Bakterien mit rekombinanter DNA konnten ca. 3000 Penizillin resistente Kolonien gezählt werden. Für eine Koloniehybridisierung stand nicht genügend ³²P markierte cDNA zur Verfügung (zu wenig RNA). Aus diesem Grund wurden 200 Kolonien zunächst mit der Methode von Birnboim auf cDNA-Inserts untersucht (Daten nicht gezeigt).

Wie von den vorausgegangenen Versuchen mit AMV-RNA zu

erwarten war, zeigten 99% dieser Klone keine, oder nur sehr kleine Insert-Fragmente (>100 bp), die für spätere Untersuchungen ungeeignet schienen. Jedoch enthielten zwei der untersuchten Transformanten eingebaute cDNA-Fragmente mit einer Länge von jeweils ca. 450 bp. Abbildung 17a zeigt die im folgenden mit Klon A und Klon B bezeichneten, gereinigten DNAs.

3.3.1 Handelt es sich bei den klonierten Proben um Huhn-spezifische Gene?

Hybridisierungsexperimente sollten zunächst klären, ob die Inserts der beiden Klone identisch sind. Zudem mußte sichergestellt werden, daß es sich bei diesen DNA-Fragmenten um Huhn-spezifische Sequenzen handelt.

Um die erste Frage zu beantworten, wurden je $100\text{ }\mu\text{g}$ der rekombinaten Plasmide mit Pvu II und Pst I verdaut und die daraus resultierenden Insert-Fragmente der beiden Klone über Agarosegelelektrophorese isoliert. Mit diesen gereinigten Fragmenten wurden nach Nicktranslation alle im folgenden beschriebenen Hybridisierungsexperimente (Southern und Northern Blot Analysen) durchgeführt.

Für die Fragestellung der Identität der klonierten cDNAs wurden je 100 pg dieser Inserts im Southern Blot unter stringenten Bedingungen analysiert (6.14). Wie aus Abbildung 17b ersichtlich ist, kann zwischen den beiden Sequenzen keine Hybridisierung nachgewiesen werden; das heißt, es handelt es sich bei den beiden Inserts um unterschiedliche DNA-Sequenzen.

Abbildung 18 zeigt einen Southern Blot (6.14) mit chromosomaler Hühner-DNA. Wie daraus entnommen werden kann, liegt die Sequenz des Klons A einmal im Genom vor, während mit

ABBILDUNG 17a

ABBILDUNG 17b

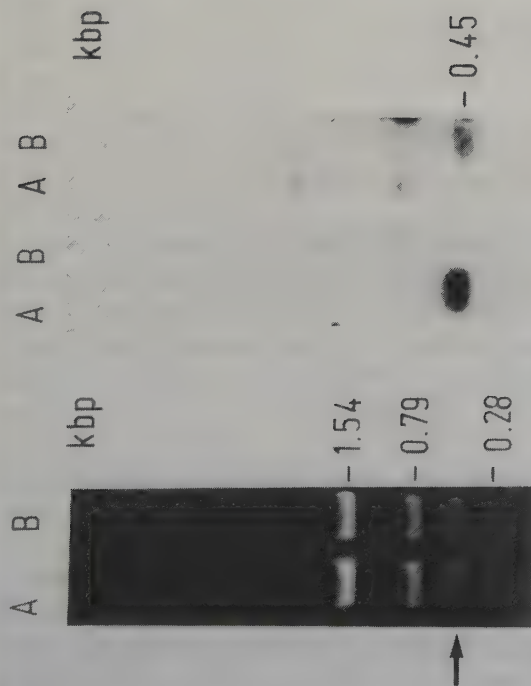


ABBILDUNG 18

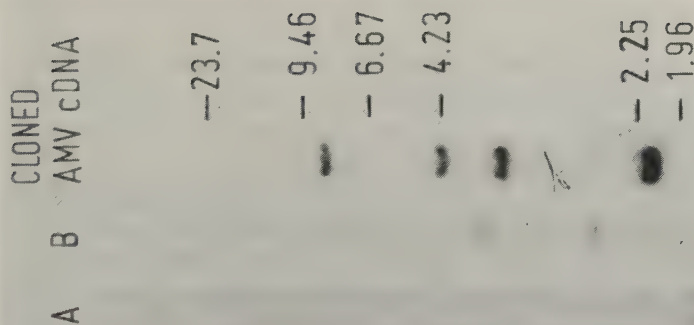


Abbildung 17: a) Agarosegelelektrophorese der Klone A und B nach Verdau mit den Restriktionsenzymen Pst I und Pvu II; die mit dem Pfeil gekennzeichneten Banden reflektieren die amplifizierte cDNA; b) Southern Blot Analyse der Klone A und B: von links nach rechts: Gereinigte Inserts der Klone A und B hybridisiert mit markiertem Klon A₃₂P Insert, Gereinigte Inserts der Klone A und B hybridisiert mit ³²P markiertem Klon B Insert.

Abbildung 18: Southern Blot Analyse von Hind III verdauter chromosomaler DNA des Huhns hybridisiert mit ³²P markierten Inserts von Klon A und B sowie mit klonierter AMV-cDNA.

Klon B zwei Banden beobachtet werden können. Auf letzteren Befund wird im späteren Verlauf der Arbeit noch ausführlich eingegangen werden.

Um zusätzlich zu zeigen, daß die klonierten Sequenzen nicht mit dem endogenen Retrovirus RAV-0 identisch sind, wurde die chromosomale DNA des Huhns ebenfalls mit dem AMV-Klon AK6 analysiert. Sollten die Loci der beiden Klone von RAV-0 verschieden sein, muß ein unterschiedliches Muster der integrierten Sequenzen postuliert werden. AMV-RNA und RAV-0-RNA zeigen ca. 70% Sequenzhomologien (vgl. 3.1.4, Tabelle 3). Deshalb können RAV-0-Sequenzen im Hühnergenom mit einer radioaktiv markierten AMV-DNA nachgewiesen werden.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich ist, handelt es sich bei den klonierten Proben um Sequenzen, die mit RAV-0 nicht identisch sind. Im Falle einer Identität müßten Signale an übereinstimmenden Position gefunden werden.

3.3.2 Sind die Klone A und B partikelspezifisch?

Nachdem sichergestellt worden war, daß die klonierten cDNAs Nukleotidsequenzen des Huhns repräsentieren, wurde untersucht, ob diese mit den Kernen der Retroviralen Elemente assoziiert sind, oder ob es sich um cDNAs von mRNAs handelt, die möglicherweise als Kontamination in der RVE-RNA Präparation vorliegen.

Wie oben gezeigt, bandieren mit einer Lipidmembran umhüllte Partikel im Saccharosegleichgewichtgradienten bei einer Dichte von 1,15 g/ml, während die Kerne dieser Partikel eine höhere Dichte aufweisen und daher tiefer in den Rohrzuckergradienten eindringen (Mondal et al. 1980, 1983). Falls die klonierten cDNAs also mit den Kernstrukturen assoziiert sind, muß die RNA in jedem Fall in einem solchen Gradienten

in den Fraktionen mit Reverser Transkriptase Aktivität vorliegen und dort nachweisbar sein, da dieses Enzym ebenfalls an den Kern der Partikel gebunden ist.

Um diese Aussage zu prüfen, wurde folgendes Experiment vorbereitet: Aus der Amnionflüssigkeit von 150 11 Tage alten Hühnerembryos wurden, wie oben beschrieben, die Partikel pelletiert. Das Pellet wurde in 400 μ l TNE-Puffer resuspendiert und in zwei gleichgroße Portionen geteilt. Ein Ansatz wurde auf eine Endkonzentration von 0,1% NP40 eingestellt, das die Lipidmembran der Elemente zerstört, und bei 4°C eine Stunde leicht geschüttelt. Die zweite Probe stand unbehandelt in einem Eisbad.

Anschließend wurden die beiden Proben auf je einen vorbereiteten 10 bis 50%igen Saccharosedichtegradienten geschichtet und einer 16 stündigen Zentrifugation bei 38000 rpm unterworfen. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen in ca. 0,5 ml große Fraktionen vom Boden ausgetropft, und die RT-Aktivität mit poly(rC)·oligo(dG) von jeder Fraktion bestimmt (6.4).

Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt. Wie unter 3.1 bereits gezeigt, findet man bei der unbehandelten Probe die größte RT-Aktivität bei einer Dichte von 1,15 g/ml (Fraktionen 8-11). Der kleine Peak bei einer Dichte von ca. 1,2 (Fraktionen 4-7) muß auf die Anwesenheit geringer Mengen Cores zurückgeführt werden, die vermutlich aus während der Anreicherung geplatzten Partikeln stammen.

In der NP40 behandelten Probe ist der Peak bei 1,15 g/ml deutlich geringer (Fraktionen 8-10). Hier kann eine breite Verteilung von Enzymaktivität in den unteren Fraktionen (2-7) des Gradienten beobachtet werden. Die hohe Aktivität in den Fraktionen mit geringerer Dichte (Fraktionen 12 bis 14) muß auf freie RT zurückgeführt werden, die durch die NP40 Behandlung aus den Kernstrukturen freigesetzt wurde.

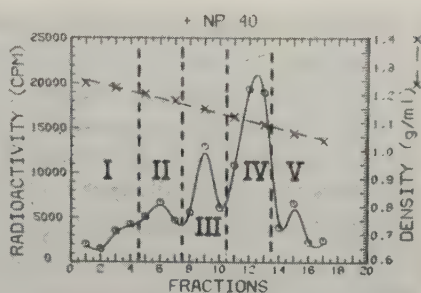
Dies erklärt auch die relativ niedrige Enzymaktivität in den Kernfraktionen (2-7).

Um eine Assoziation der klonierten Proben mit den Partikeln zu prüfen, wurden die Fraktionen beider Gradienten, wie in Abbildung 18 mit den römischen Ziffern gekennzeichnet, in je 5 Portionen vereinigt, die Partikel durch Zentrifugation pelletiert (6.2), und die RNA aus den Pellets isoliert (6.7).

Nach einer Agarosegelelektrophorese der 10 Proben wurden die RNAs auf DBM-Papier transferiert (Northern Blot 6.15) und sukzessive mit ^{32}P markierten Inserts der Klonen A und B hybridisiert. Zwischen den Hybridisierungen war der Filter 5 Minuten in Wasser gekocht worden, um die hybridisierte DNA des vorangegangenen Versuchs zu entfernen. Eine zweitägige Exposition mit einem Röntgenfilm bestätigte die Ablösung der Radioaktivität des vorangegangenen Versuchs.

Wie Abbildung 19 zeigt, findet man bei beiden Inserts in der unbehandelten Probe das stärkste Signal bei ca. 25S im Fraktionenpool mit der höchsten RT-Aktivität (Fraktionenpool III). Bei der NP 40 behandelten Probe drang die RNA jedoch tiefer in den Gradienten ein (Fraktionen I und II), was nur durch eine Assoziation beider Proben mit den Kernstrukturen erklärt werden kann.

Dieses Experiment zeigt weiterhin, daß die isolierten cDNAs entweder von verschiedenen Regionen einer 25S RNA stammen, oder cDNA-Produkte zwei verschiedener RNA-Moleküle mit gleicher Größe darstellen. Eine weitere dünne Bande bei ca. 40-50S weist darauf hin, daß die RNA als Dimer in den Partikeln vorliegt, und durch die Behandlung mit Glyoxal nicht quantitativ in Einzelmoleküle getrennt wurde (Vergleiche Abbildung 4, Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen).



I II III IV V

- 55

I II III IV V

- 55

I II III IV V

- 55

Da durch Flüssigkeitshybridisierungen gezeigt worden war (vergleiche 3.4), daß die RVE-RNA Sequenzhomologien zur AMV-RNA aufweist, wurde der Filter ebenfalls mit dem AMV-Klon AK6 hybridisiert. Dabei kann ein identisches Muster an Banden beobachtet werden, was erneut auf eine Sequenzhomologie der RVE-RNA mit AMV-RNA hinweist und somit diesen früheren Befund bestätigt.

3.3.3 Klon A und B: Sequenzhomologien mit dem AMV-Genom

Um den Befund der Sequenzhomologien noch weiter abzusichern, schien es notwendig, noch weitere Hybridisierungsexperimente mit AMV-RNA und mit chromosomaler DNA durchzuführen.

Zur Klärung der Sequenzhomologie wurde AMV-RNA nach Gelelektrophorese auf Nitrozellulosefilter transferiert (Glyoxalgel, 1% Agarose, Vgl. 5.15), und mit nicktranslatierten Inserts der Klone A und B hybridisiert.

Durch die Klonierungsstrategie (vgl. Abb. 6) war zu erwarten, daß die Inserts poly(A-T)-Sequenzen enthalten, deren T-Strang mit dem poly(A) der AMV-RNA basenpaaren kann. Deshalb wurde die Hybridisierung bei 60°C (Schmelzpunkt von poly(AT) durchgeführt, und die Insert-DNA mit ³²PdCTP nicktranslatiert, um diesen unerwünschten Effekt zu umgehen. Nach der Hybridisierung wurde der Filter mit Hochsalzpuffer (2xSSC, vgl. 5.14) vorsichtig bei 50°C gewaschen. Unter diesen Bedingungen bleiben auch DNA-RNA Hybride mit "Missmatches" erhalten, d.h., es sollte auch ein Signal im Falle keiner vollständigen Sequenzhomologie beobachtet werden können.

Abbildung 20 zeigt das Ergebnis dieser Versuche. Wie daraus entnommen werden kann, besitzen beide Klone Sequenzhomologien zum Genom dieses exogenen Retrovirus, da in beiden

Fällen ein positives Signal bei 35S vorliegt. Eine Hybridisierung mit 5 ug gesamt-RNA verlief negativ (Daten nicht gezeigt). Damit kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die positiven Signale die Folge von Hybridisierungen mit dem poly(A) der RNA darstellen (hybridisierte T-Stränge mit folgender nicht hybridisierter ^{32}P dCMP markierter DNA). In einem solchen Fall müßte jede poly(A) enthaltende RNA in der Autoradiographie aufleuchten.

Es wurde bereits gezeigt, daß die beiden Klone nicht sequenzidentisch sind. Daher muß postuliert werden, daß die festgestellten Sequenzhomologien auf unterschiedlichen Abschnitten des AMV-Genoms liegen. Daher wurde weiter versucht, die Sequenzhomologien der Klone auf dem AMV-Genom zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurde das gereinigte Insert des Klons AK6, welches die Sequenzen des 3'Endes (ca. 1050 bp) der AMV-RNA enthält, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die resultierenden Fragmente nach Gelelektrophorese (1,3% Agarose) auf Nitrozellulosefilter transferiert (Southern 5.15). Die Wahl der Enzyme war durch eine vom Computer erstellte Restriktionsenzymkarte getroffen worden. Dies war möglich, weil das 3'Ende des AMV-Genoms bereits sequenziert ist (Rushlow et al. 1982, Klempnauer et al. 1982), und die Sequenz in der Sequenzdatenbank (EMBL) vorliegt.

Abbildung 21 zeigt oben die Restriktionsenzymkarte des Klons AK6 mit den Schnittstellen der Enzyme, die so gewählt wurden, daß die dem 3'Ende der RNA entsprechenden Fragmente unterschiedliche Länge aufweisen (Abb. 21, b,c,d,e, durchgezogene Linien). Sollte also eine Sequenzhomologie zum 3'Ende dieses Genoms vorliegen, müßte demnach - bei einem Auftrag der Proben entsprechend der zunehmenden Länge der 3'komplementären Sequenzen - nach der Hybridisierung eine "treppenartige" Signalfolge auf dem Röntgenfilm zu sehen sein.

ABBILDUNG 20

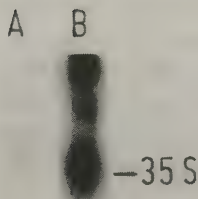


ABBILDUNG 21

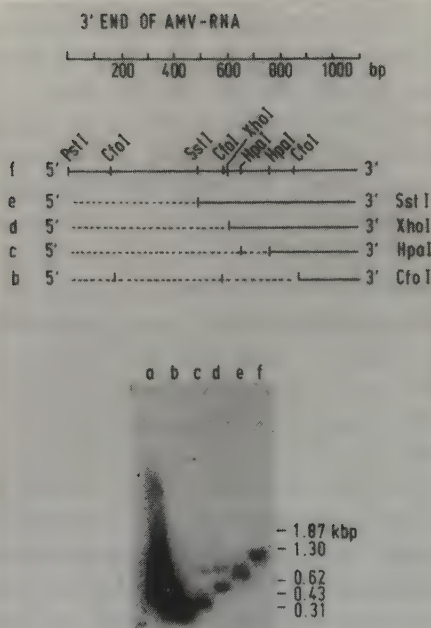


Abbildung 20: Northernblot von AMV-RNA hybridisiert mit ^{32}P markierten Inserts von Klon A und B.

Abbildung 21: Southernblot einer dem 3'OH-Ende der AMV-RNA entsprechenden klonierten cDNA (ca. 1100 bp); das gereinigte cDNA-Insert wurde mit den Restriktionsenzymen Cfo I (b), Hpa I (c), Xho I (d) und Sst I (e) (Karte oben) geschnitten und nach Agarosegelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose mit ^{32}P markiertem Klon A Insert hybridisiert. (a) = Klon A Insert (positive Kontrolle); (f) = ungeschnittenes Insert des AMV-Klons AK6.

Im Experiment wurden je 100 ng enzymverdaute AMV-DNA eingesetzt. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit Klon A, mit welchen die erwartete Signalfolge (Schlot b-e) auftritt. Schlot A enthält zur positiven Kontrolle 10 ng gereinigtes Klon A Insert. Der "Schmier" in diesem Schlot ist auf eine Überexposition des Filters zurückzuführen. Das Experiment zeigt damit fernerhin, daß die Hybridisierung mit dem komplementären Klon A um mindestens einen Faktor 100 besser ist (es wurde zehnmal weniger Klon A Insert eingesetzt), was auf eine nur geringe Sequenzhomologie hindeutet.

Das gleiche Experiment - durchgeführt mit Klon B - lieferte ein negatives Ergebnis, woraus geschlossen werden muß, daß die Homologie dieser Sequenz auf einem anderen Abschnitt der AMV-RNA lokalisiert ist.

3.3.4 Sequenzierung von Klon A und Klon B

Nachdem sichergestellt worden war, daß die klonierten Proben zwar retrovirusverwandte Nukleotidsequenzen beinhalten, mit diesen aber nicht identisch sind, wurden die Nukleotidsequenzen der beiden Inserts ermittelt. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Handelt es sich bei den klonierten Proben um mRNAs, d.h. enthalten sie ein Polyadenylierungssignal?
- Enthalten diese Sequenzen einen offenen Leserahmen, d.h., kodieren sie für ein Protein?
- Wo liegt die Sequenzhomologie zum AMV-Genom? Kann daraus eine funktionelle Bedeutung abgeleitet werden?

- Gibt es weitere Sequenzhomologien zu anderen retroviralen RNAs?

Abbildung 22 zeigt die Sequenzierungsstrategie und die Nukleotidsequenz des Klons A. Für die Sequenzierung wurde das gesamte Plasmid mit den Enzymen Rsa I, bzw. Taq I verdaut, die 5'Enden mit ^{32}P markiert, und die DNA mit den Enzymen Pst I, bzw. Pvu II und EcoR I (ca. 200 bp links der Pst I Schnittstelle) geschnitten. Die Sequenzierung erfolgte nach Maxam und Gilbert (Maxam and Gilbert, 1976).

Diese Sequenz enthält ein Polyadenylierungssignal (ATTAAA), das 9 bp vor einem 35 langen poly(A) liegt (Die Abbildung zeigt nur 4 A). Es weicht somit von dem in der Natur im allgemeinen verwendeten Polyadenylierungssignal AATAAA ab (Review: Nevins, 1983), stimmt jedoch mit der Signalsequenz der mRNA des Lyszyngens des Huhns überein (Jung et al. 1980). Die Sequenz endet mit den Nukleotiden TGC vor dem poly(A), die in vielen der bis jetzt untersuchten mRNAs ebenfalls an dieser Position gefunden werden. Damit kann also davon ausgegangen werden, daß die vorliegende Sequenz das 3'Ende einer 25S mRNA darstellt.

Bei einer weiteren Betrachtung fällt eine 14 T umfassender Bereich (Position 279-283) auf, der für mRNAs ungewöhnlich ist. Darauf soll im Diskussionsteil noch eingegangen werden. Zudem soll auf die auffallenden kurzen 5 bis 6 bp "direct repeats" hingewiesen werden, die in ungewöhnlicher Häufigkeit in dieser Sequenz vertreten sind (In Abbildung 22 durch Pfeile markiert). Eine biologische Bedeutung dieser Sequenzen bleibt jedoch zumindest vorläufig ungeklärt.

Eine 10 Basen umfassende GGG.. Sequenz vor der Position 1 ist nicht gezeigt, da diese bedingt durch die Klonierung (vgl. Abb. 6) auftritt. Sie soll jedoch als Bestätigung der Klonierungsstrategie erwähnt werden.

ABBILDUNG 22

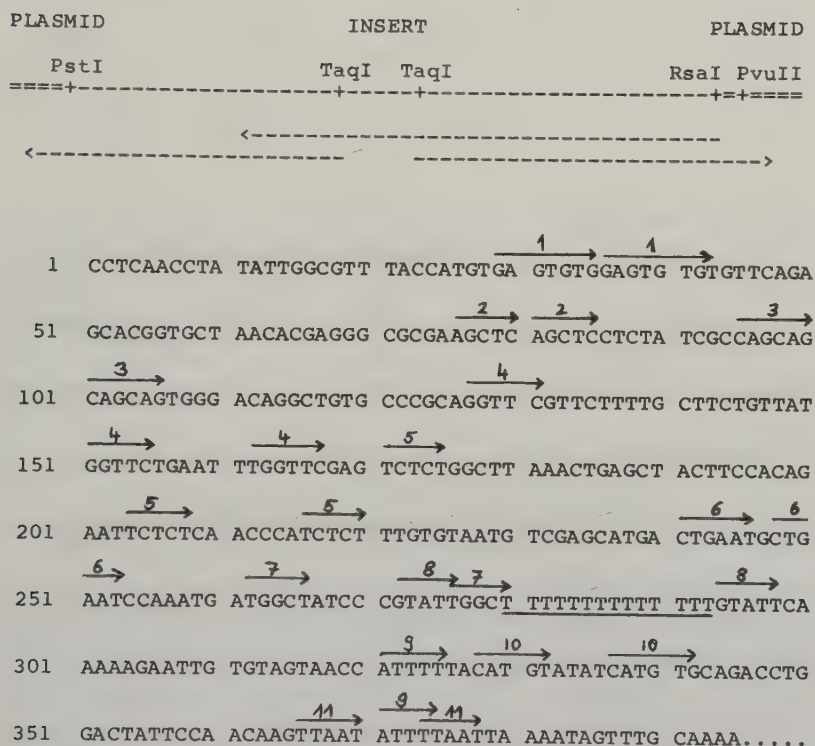


Abbildung 22: Sequenzierungsstrategie und Sequenz von Klon A: oben: Restriktionsenzymkarte des Klon A mit den für die Sequenzierung wichtigen Restriktionsenzymschnittstellen; ==: Plasmid-DNA; --: Insert; Die darunter gezeigten Pfeile geben die Richtung der Sequenzierung wieder. unten: Sequenz des klonierten cDNA Inserts: Die Pfeile über der Sequenz zeigen 5 bis 6 bp lange direkte Repeats, die unterstrichenen Bereiche markieren eine poly(T)-Region und ein potentielles Polyadenylierungssignal. Nähere Erläuterungen siehe Text.

ABBILDUNG 23

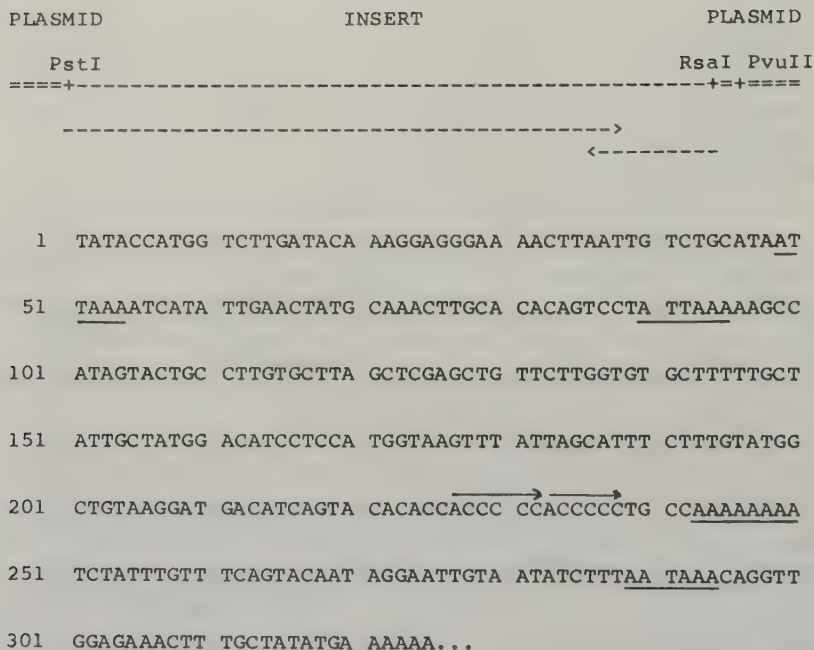


Abbildung 23: Sequenzierungsstrategie und Sequenz von Klon B; oben: Restriktionskarte des Inserts mit der flankierenden Plasmid-DNA; die Pfeile darunter geben die Richtung der Sequenzierung wieder. unten: Sequenz des Klons B: Die Pfeile oberhalb der Sequenz zeigen einen 6 bp Repeat, die Pfeile unterhalb der Sequenz zeigen eine kurze poly(A)-Region beziehungsweise mögliche Polyadenylierungssignale.

Ein Polyadenylierungssignal 26 bp vor einem ca. 120 bp langem poly(A) (Abbildung 23 zeigt nur 5 Adenylatresiduen) läßt darauf schließen, daß Klon B ebenfalls das 3' Ende einer 25S mRNA repräsentiert. Erwähnenswert sind zwei weitere Polyadelylierungssignale (ATTAAA) bei den Positionen 48 und 89, die jedoch von der RNA-Polymerase überlesen werden. Ein ähnliches Phänomen ist bei der Transkription integrierter Hepatitis B Viurus DNA in Hepatomzellen beschrieben (von Freytag, 1985).

Zudem soll auf eine 8 bp lange Adenylatsequenz hingewiesen werden (Position 242), vor der sich eine C-reiche Region befindet (ACCCCC als direct repeat). Die biologische Bedeutung bleibt auch hier unklar. Eine GGG...-Sequenz (9 bp) vor der Position 1 ist ebenfalls - analog dem Klon A - nicht gezeigt.

3.3.5 Klon A: Eine LTR-ähnliche Sequenz

Mit der ermittelten Sequenz wurden mit Hilfe des Computers Sequenzvergleiche mit retroviralen Genomen durchgeführt. Wie bereits erwähnt, befindet sich in der ermittelten Klon A Basenfolge eine poly(T)-Region. Gemäß dieser werden im folgenden die Basen 1 - 280 des Klons A als Prä-T-Region, beziehungsweise die Basen 295 - 391 als Post-T-Region bezeichnet. Um irreführende Resultate bei den folgenden Computeranalysen zu vermeiden, empfahl es sich, diese T-Region bei den durchzuführenden Sequenzvergleichen auszuklammern. Sie zeigt mit jeder T-reichen Sequenz ein hohes Maß an Übereinstimmungen und führt somit - bedingt durch die Rechenstrategie des Computers - leicht zu Verfälschungen der Ergebnisse.

Wie aufgrund der Hybridisierungsexperimente zu erwarten

```

539 NNNNNCAGGA..G..TGACACGTCCTA.GGC..AAATATAA..CTCTCC..TA.....AAAAAGGACGGGTTT.....CGT
    ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
48 CAGAGCAGGT..GCTAACACG...AGGCGCGGAAGCTCAGCTCCTC..TATCGCAGCAGCA...GCAGT..GGACACAGGCTGTGCCGCGCAG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1644 CAGAGTATGATTGGATAACAGG...ATGGCACCA.....TTTCATCGTGGCGCATGCTGATTGGTGCACCTAAGGAGTTG..TGTAACC.CAC

TTTCTCTCTCTTGGCTTCTTACACTCTTGCTCCTGAAGAT.GAATAAACTTT.....TGC CGCAGAAGTTCTGG.....TCTG.TGGTGTT
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GTTCGTTCTTTTGGCTTCTGT...TATGGTT..CTGAA(17)GCTTAACCTGAGCTACTTCCACAGAA..TTCTCTCAACCCCATCTCTTTTGTGT.
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GAATGTACTTAAGCTT.....GTAGTTGCT.AA....CAATAAAGT..GCCA.TTCTAC.....CTCTCACCACAT....TGGTGTTG
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

<----- U3 -----+-----+----- R -----+----- U5----->

CTTCCT.....CGCGGG..GCGTGA..GAACGGG....TCT.AATAACA 715
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.....AATGTCGA..GCATGACTGAATG.....CTGAATCCAAATGATGGCTATCC 270
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CA.CCT(14)ACCGTCGATTCCCTGAC.GACTCGGAACACCTGAATGAAGCTGAAGCT.TCA 1857
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
----- U5 ----->

```

Abbildung 24: Computersequenzvergleich der Prä-T-Region des Klons A (mittlere Sequenz) mit den LTRs von IAP (obere Sequenz) und AMV (untere Sequenz). Die Zahlen geben die Basenpositionen der Publikationen an (Kuff et al. 1983, Rushlow et al. 1982). Ein * markiert übereinstimmende Basen, die Pfeile unterhalb der Sequenz zeigen die U3, R und U5 Region der AMV-Sequenz. Programm: Bestfit und Gap des UWGCG-Pakets der University of Wisconsin; gap weight: 3,0; gap length weight: 0,3.

(Abb. 20), zeigt die Klon A Sequenz signifikante Homologien zum LTR-Bereich des AMV-Genoms (Abbildung 24). In anderen Genbereichen werden bei gezielter Analyse nur zufällige Übereinstimmungen detektiert, wie sie beispielsweise auch mit der Sequenz des bakteriellen Plasmids pBR322 gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Um die Signifikanz der gefundenen Homologien mit der LTR-Region abzusichern, wurden weitere Computerstudien mit LTRS anderer Retroviren sowie mit dem LTR der intrazisternalen A-Partikel der Maus durchgeführt. Abbildung 24 zeigt die Sequenzhomologien zu AMV-RNA (untere Sequenz), die von allen untersuchten viralen Sequenzen (RSV, RAV-O, MLV, MMTV, SSV) die besten Homologien aufweist. Überraschenderweise beschränken sich diese auf die Prä-T-Region, umfassen jedoch den gesamten retroviralen LTR-Bereich, also U3, R und U5! Wie Abbildung 24 weiter darlegt, trifft dies ebenso für die LTR-Sequenz der IAPs zu.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu allen Ergebnissen mit retroviralen RNA-Genomen: Wie bereits in der Einleitung geschildert, endet die Transkription des Provirus exakt mit dem letzten Nukleotid der R-Region. Die gezeigte Sequenzhomologie legt die Schlußfolgerung nahe, daß durch das Fehlen (Mutation?) des Polyadenylierungssignals, welches sich bei Vögelretroviren zwei Basen vor der R-Region befindet (in Abb. 24 eingerahmt), eine Transkription über die U5-analoge Region hinaus bewirkt wird.

In der Literatur wird wiederholt auf die Ähnlichkeit der LTR-Sequenzen der Proviren mit den LTRs der Transposons hingewiesen (Temin, 1983; Shiba und Saigo, 1983). Deshalb wurde die Sequenz des Klons A ebenfalls mit den Transposons-LTRs von Drosophila, Hefe und Bakterien verglichen.

Abbildung 25 zeigt Bereiche der Klon A Sequenz mit auffälligen Homologien zu den Copia-Elementen 17.6 und 412

Copia Element 17.6

```

1 CCTCAACC...TATATTGGGCTTTTAC.CATGTGAGTGGAGTGTGTCTCA.....GAGCAGGTGCTAAACA.....CGAGGGCGC... 73
* *** ** ** ** **
17 ACAAAACACATAACATAGAGTAACATATGAAAGCCGATAGTAACAAATAAGTAGCCACCATGCTAAATG(21)CAACTCTGCATT 123
* *** ** ** ** *
74 ..GAAGCTCAGCTCCTCTATCCGACGACGACGAGTGGG...ACAGGCTGTGCCCGAG..GTTCG...TTCTT...TTGCT.TCTGT 147
* *** ** ** ** *
124 TTGACACCCCATCTGTAT.GCATCTGC.GCAGTATG(13)AAATCTTTGACAGGGGCACTTAGCCATTCTT(22)CTGCTCTCTCT 238
* *** ** ** ** *
148 TATGGTTCT.....GAAT.TTGGTTGAGTCTCTGGCTTAA..ACTGAGCTA..CTT.....CCACAGA..ATTCT.CTCAA 211
* *** ** ** ** *
239 GAGGCTCTCTTCACTTAAAGAAATCCAAGACCAATGCTCTCCAAAACATAACATATTTTAAACAAGCAGAGGCTCTCTCTCA. 327
* *** ** ** ** *
212 CCCATCTCTTT.GTGTAAATGTCGAG.CATGA.CTGAATGCTGAATCCA.AATGATGGCTATC....CCGTA..TTGGCTTTTTTTTTTTT 291
* *** ** ** ** *
328 ..TTTTCACCTTTCATTGATTTTCACTCTTAAGCTGAAGC.TTAATCAATAACAAACAACATCGATACCGAAATTTGATTCGTTTATTT 415
* *** ** ** ** *
292 TTGTATTCAAAAAG.AAATTGTAGTAACCAATT..T.TTACATGATATATCATGTGCAGACCTGGACTATTCCACACA.AGTTAATA.TTTT 375
* *** ** ** ** *
416 TGG...CAAAACTCAATTTTC.AG....CGTTGGTCTTAGT.....TCATATTCCGAAC.GGTCCATT.TAATGACTCAAAACTATT 488
* *** ** ** ** *
376 AATT..AA..AATAGTTTGCRA.. 393
*** ** * *****
489 TATTGCAACCAATTTATTGCAATT 512

```

Copia Element 412

```

117 TGTGCGCGAGGTTTCGTTCTTTTGGTCTTG.TTATGGTTCTGAA.(9).GAGTCTCTGGCTTAAAC..TGAGCTACTTCCACAGAAATCT 206
* ** ** ** **
99 TATGGCAGCACTT.GTTGCTATGTTTATGTTTATGTTATGCA(243)GAGACTCTG...TAGACGTTGAGCTG....ACAGAACCAT 416
* ** ** ** *
207 CTCAAACCATCTCT.TTGTGTAATCGCAGCATGACTGAATGCTGAATCCAAATGATGGCTATCCGTTATTTGGCTTTTTTTTTTTTGT 295
* *** ** ** ** *
417 TTCTCGCTA.CTCTAAATCAAAGAAGAAATGAATAAT..ATATGTCAGCCGACGGCT..GCCTTAAAC..... 480
* *** ** ** ** *
296 ATTCAAAAAGATCTGTAGTAACCATTTTTCATGTATATCATCTGCAGACCTGGACTATTCCAAACAAGTTAATATTTAAATAATAG 386
* *** ** ** ** *
481 ..TTAAACGGGACTGTG.....TTCTTAATTGGAGTTTCATC.....ATTAC..ACAAGTGTAATGTTAACGAATCTAG 550
* *** ** ** ** *

```

Abbildung 25: Sequenzvergleich von Klon A mit den LTRs der Copia Elemente 17.6 (Kugimiya et al. 1983) und 412, Klon cM 454 (Will et al. 1981); Programm: Bestfit und Gap des UWCG-Pakets der University of Wisconsin; Gap weight: 2.0 - 3.0; gap length weight: 0.2 - 0.3. Die obere Sequenz gibt jeweils die Klon A Basenfolge wieder. Die angegebenen Zahlen reflektieren die Positionen der Basen nach Abbildung 22 bzw. der zitierten Publikationen.

```

169 TTCGCTTTTTCAAATTTT.TTTTTTTTAAATC.GCAATAA...CATCGTTT.GCCCA..CGTTT.
** ***
275 TTGGCT.....TTTT.TTTTTTTTGTATT..CAAAAA.GAATTGTGTAG..TAACCATTTTACATGTATATCAT
* * *
381 ATCGATA..CCGAATTTTGA TTCGTTTATTTTGGCAAAATCAATTTT.CAGCGTTGGTCTTAGTTTCATAT...TC.G
** **
474 CTGCCTT.....AAACTT.....AAAAAGGACTGTGTG.....TTCTTAATTGGAGTTTCAT

```

KONSENSUS: <- T-REGION -> CAAAA

```

.TGCCCCACCCTTTAGAAATTTT.GAAAAAATTTATACCTTTAG..AAAAATATAAGGCTTTTAA 271
*** ** *
GTGCAGACC...TGGACTATTCCCAACAAGTTAATATTTTAAATTAATAA....TAGTTTGCA 391
* * *
GAACGGTCCATTTAATAGACT.CAA.AACT....ATTT..ATTGCAACCATTTA.TTTGCA 508
*** *
.....CAATTACA.CAAGTGTAAATGTTACGAATC....TAG 550

```

KONSENSUS: TT.CAA.AA.T ATTTT

Abbildung 26: Computersequenzvergleich der Post-T-Region des Klon A mit Transposon-LTRs von Drosophila. Obere Sequenz: FB4 (Potter, 1982); 2. Sequenz: Klon A; 3. Sequenz: Copia-Element 17.6 (Kugimya et al. 1983); 4. Sequenz: Copia-Element 412, Klon cdm 454 (Will et al. 1981); Die Zahlen reflektieren die Nukleotidpositionen gemäß der zitierten Publikationen. Ein * markiert eine Basenhomologie von Klon A zu den gezeigten Sequenzen. Programm wie in Abbildung 24.

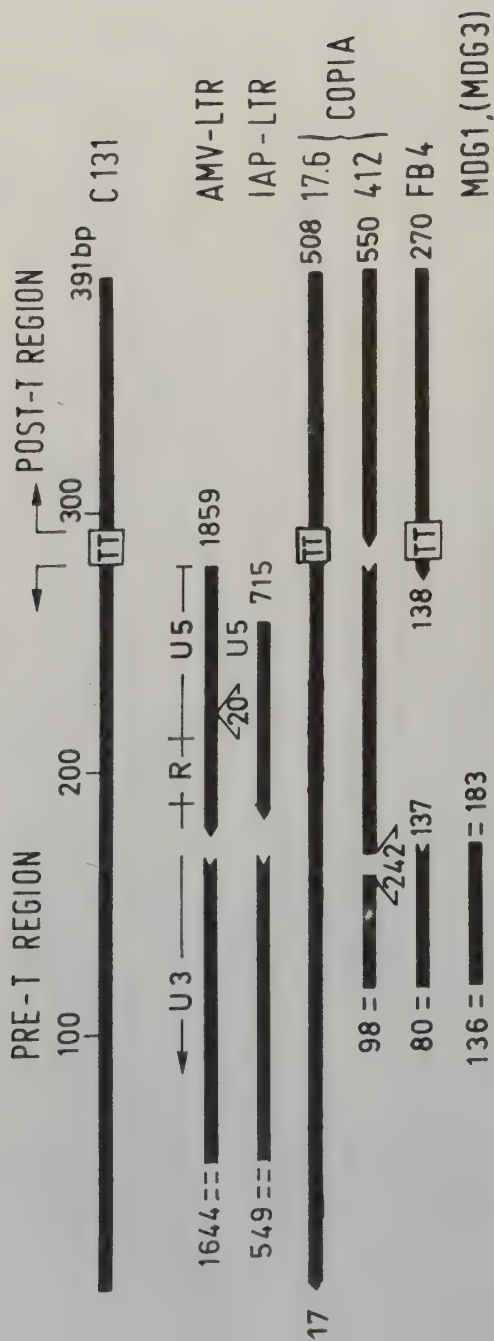


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien von Klon A (oben) zu retroviralen und Transposon LTRs. Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen gemäß der publizierten Sequenzen an. Die schwarzen Bereiche zeigen die Abschnitte mit signifikanten Homologien, ein Δ markiert eine Insertion mit Längenangabe, freie Bereiche spiegeln Gaps wieder.

von *Drosophila*. Dabei fällt auf, daß sich - im Gegensatz zu retroviralen LTRs - diese Übereinstimmungen (60-70%) nicht nur auf die Prä-T-Region beschränken, sondern den gesamten sequenzierten Bereich umfassen. Besonders bemerkenswert ist die Homologie zum Element 17.6, dessen LTR nach Literaturangabe die besten Übereinstimmungen zu retroviralen LTRs aufweist. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, erstrecken sich die Homologien der RVE-Sequenz über die gesamte LTR-Region dieses Elements. Die durchgeführte Studie legt fernerhin die Schlußfolgerung nahe, daß im Laufe der Evolution eine Reihe von Deletionen in der RVE-Sequenz stattgefunden hat: Für einen optimalen Vergleich mußten fast ausschließlich Lücken (Gaps) in diese Basenfolge eingefügt werden!

Abbildung 26 zeigt die Homologien der Post-T-Region mit 412 (3. Sequenz von oben) und 17.6 (4. Sequenz) sowie mit dem linken LTR des Elements FB4 (obere Sequenz), das ebenfalls eine poly(T)-Region enthält. Auffällig ist eine CAAAAA-Sequenz die - mit geringen Modifikationen - in allen gezeigten Sequenzen vorliegt (Abb. 26 eingerahmter Bereich).

Abbildung 27 faßt die Homologien der retroviralen und Transposons-LTRs zu Klon A schematisch zusammen. Sequenzvergleiche mit weiteren Transposon-LTRs von Hefe (TY1, TY912) und *E. coli* (IS2, Tn5) enthüllen ebenfalls Bereiche mit guten Homologien, die jedoch nicht die gezeigte Signifikanz wie zu den *Drosophila*-Sequenzen erreichen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten bestätigen jedoch weiter, daß das 3'Ende der klonierten 25S mRNA eine LTR-ähnliche Sequenz darstellt.

3.3.6 Computersequenzvergleiche mit Klon B

Computersequenzvergleiche zeigen eine schwache Homologie des Klons B zu einem Abschnitt des AMV-Genoms, der zwischen dem

. Pol- und dem Myb-Gen liegt (Abbildung 28a). Diese Homologie erklärt die Kreuzhybridisierung mit der AMV-RNA in der Northern Analyse (vgl. Abbildung 20), läßt jedoch die Frage nach der biologischen Bedeutung offen. Bemerkenswert bleibt eine ca. 100 bp lange, jedoch schwache Homologie zu Klon A, die zwischen den beschriebenen LTR-ähnlichen Sequenzen liegt (Abbildung 28b).

3.3.7 Klon A und Klon B enthalten offene Leserahmen für hypothetische Proteine

Weitere Computerstudien mit den ermittelten Sequenzen zeigen, daß die entsprechenden RNAs möglicherweise für Proteine kodieren. Beide enthalten, wie in Abbildung 29 gezeigt, vom 5' Ende her offenen Leserahmen, das heißt das Carboxylende von hypothetischen Proteinen.

Für Klon A wurden 2 rasterverschobene Sequenzen ermittelt, die in unterschiedlich langen Polypeptidketten resultieren (61 und 19 Aminosäuren, Stopkodons bei Position 185 (UGA) bzw. bei Position 59 (UAA)). Nachdem das 5' Ende der dem Klon A entsprechenden RNA noch nicht untersucht ist, können jedoch noch keine Aussagen darüber gemacht werden, ob einer der beiden Leserahmen in vivo translatiert wird. Klon B weist einen offenen Leserahmen für das Carboxylende eines 19 Aminosäure langen hypothetischen Proteins auf. Auch hier gilt was für Klon A beschrieben ist.

Sequenzvergleiche der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäurefolge mit allen in der Proteindatenbank vorliegenden Sequenzen lieferten ein negatives Resultat (Daten nicht gezeigt). Somit kann zumindest vorläufig keine Aussage darüber gemacht werden, für welche Proteine (Core-Strukturen, Polymerase?) diese RNAs möglicherweise kodieren.

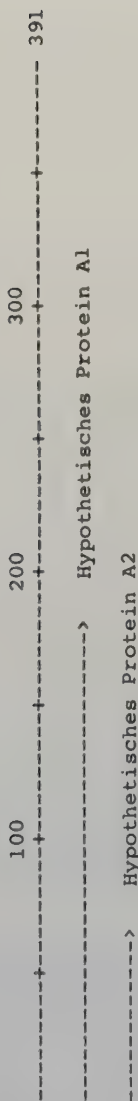
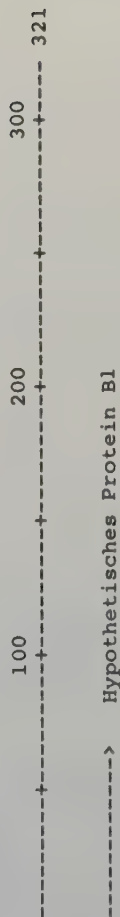
ABBILDUNG 29aABBILDUNG 29b

Abbildung 29: a) Sequenz von Klon A (391 bp); darunter die vom Computer abgeleiteten Carboxylenden von hypothetischen Proteinen. b) Sequenz des Klons B (321 bp) mit dem vom Computer ermittelten Leserahmen für das Carboxylende eines Proteins. Computerprogramm: Seq_Analyze.

3.3.8 Sind Klon A und Klon B unterschiedliche Splicingprodukte einer Geneinheit?

Integrierte Proviren stellen eine Transkriptionseinheit dar, von der, beginnend im 5'LTR, eine mRNA abgelesen wird, die für die Proteinbiosynthese in verschieden große mRNAs prozessiert wird. Die nachgewiesenen Sequenzhomologien der beiden Klone zu verschiedenen Regionen des AMV-Genoms machten es zunächst wahrscheinlich, daß die RVE-RNAs ebenfalls Produkte einer Geneinheit (unbekannter endogener Retrovirus?) darstellen.

Diese Fragestellung kann durch eine genaue Lokalisierung der beiden klonierten cDNAs auf chromosomaler Ebene durch Erstellung einer Restriktionsenzymkarte beantwortet werden. Die Erstellung der in Abbildung 30 gezeigten Karte soll an Hand eines Schemas mit Klon A skizziert werden, nach welchem alle weiteren Schnittstellen ermittelt wurden. Die angegebenen Fragmentgrößen wurden durch Hind III verdaute -DNA als Standard mit einem von mir entwickelten Computerprogramm ermittelt, dessen Genauigkeit mit $\pm 3\%$ angegeben werden kann (Siehe Methoden).

Die Größe aller durch Southern Blot Analysen (Daten nicht gezeigt) ermittelten chromosomalen Fragmente sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Wie bereits in Abbildung 17c und 21 gezeigt, resultieren nach einem Southern Blot mit Klon B und genomischer DNA nach Restriktionsenzym-Verdau zwei Banden. Der Befund, daß das eine oder das andere Allel in einigen Tieren im homozygotem Zustand vorliegt, ermöglicht eine genaue Kartierung beider Loci. Auf diese Allelheterogenität soll unter 3.3.11 noch ausführlich eingegangen werden. Die beiden Loci wurden in Tabelle 6 mit (1) bzw. (2) bezeichnet.

Die Sequenz des Klons A weist in der Mitte eine Eco RI

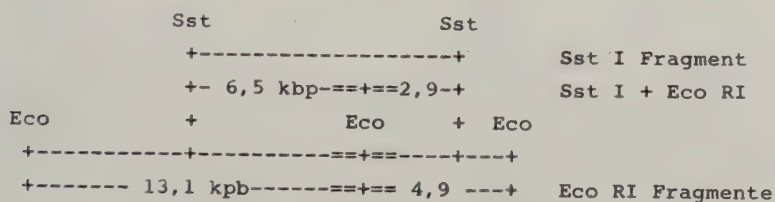
TABELLE 6

CHROMOSOMALE DNA-FRAGMENTE, DIE NACH RESTRIKTIONSENZYMVERDAU MIT KLON A ODER B HYBRIDISIEREN

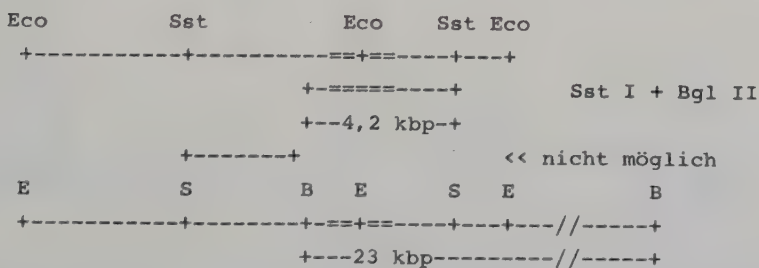
1. Enzym	2. Enzym	Klon A	KlonB(1)	KlonB(2)
Sst I	-	9.46	17.4	11.4
Sst I	+ EcoR I	6.5+2.9	3.1	3.1
Sst I	+ Bgl II	4.2	13.0	7.2
Sst I	+ Hpa I	nb	6.9	2.9
Sst I	+ Stu I	8.6	12.5	11.4
Sst I	+ Sph I	7.1	nb	nb
Sst I	+ Xba I	nb	6.9	1.9
Stu I	-	13.2	13.6	19
Stu I	+ Bcl I	nb	7.9	11.4
Stu I	+ Bgl II	3.4	8.1	14.2
Stu I	+ EcoR I	2.2+nb	3.1	3.1
Stu I	+ Hpa I	nb	3.7	4.5
Bgl II	-	23	11.7	17.7
Bcl I	-	nb	8.4	11.8
EcoR I	-	13.1+4.9	3.1	3.1
EcoR I	+ Rsa I	0.54+0.44	0.49	0.49
EcoR I	+ Xba I	nb	1.2	1.2
EcoR I	+ Hpa I	nb	2.1	2.1
EcoR I	+ Hae III	nb	0.6	0.6
Hae III	-	nb	1.25	4.2
Hind III	-	1.5	2.5	3.7
Hpa I	-	23	7.0	4.5
Hpa I	+ Hae III	nb	3.3	nb
Hpa I	+ Xba I	nb	2.0	nb
Hpa I	+ Rsa I	nb	0.48+0.41	0.48+0.41
Pst I	-	3.1	0.8	0.8
Pvu II	-	2.3	0.9	0.9
Rsa I	-	nb	0.49+0.41	0.49+0.41
Sph I	-	nb	6.7	8.2
Xba I	-	nb	7.8	1.8
Xba I	+ Rsa I	nb	0.48+0.41	0.48+0.42

Die Tabelle gibt die Größen der aus dem Restriktionsenzym-verdau resultierenden DNA-Fragmente in kbp wieder, die mit Klon A oder B im Southern Blot nachgewiesen werden können, d.h., auf denen diese Sequenzen lokalisiert sind. Bei Doppelverdau wurde die DNA nach Schneiden mit dem ersten Enzym gereinigt (Phenolextraktion, zweimalige Ethanolpräzipitation). Dies schien sinnvoll, da verschiedene Restriktionsenzyme bei unterschiedlicher Salzkonzentration schneiden (vgl. Methoden). nb: nicht bestimmt oder nicht auswertbar.

Schnittstelle auf. Dadurch resultieren in einem Southern Blot mit Eco RI verdauter chromosomalen DNA und Klon A als Sonde zwei Banden, deren Größen mit 13,1 und 4,9 kbp berechnet wurden. Ein Doppelverdau mit Eco RI und Sst I ergibt wiederum 2 Banden mit Fragmentgrößen von 6,5 und 2,9 kbp. Damit kann die exakte Lage der Klon A Sequenz innerhalb des Sst I Fragments (9,46 kbp) festgelegt werden. Sie muß sich 2,9 kbp vor dem rechten Sst I Ort befinden.



Ein Doppelverdau mit Sst I und Bgl II liefert ein 4,2 kbp Fragment, was zur Schlußfolgerung führt, daß eine Bgl II Stelle 4,2 kbp links bezüglich des rechten Sst I Ortes liegt. Eine andere Position ist aufgrund der fixierten Position der Klon A Sequenz nicht möglich, weil diese als Sonde zur Bestimmung der Fragmentgröße eingesetzt wurde. Ein Bgl II Verdau resultiert in einem 23 kbp Fragment. Damit kann auch die zweite Schnittstelle auf der Karte angegeben werden.



Anhand dieses Verfahrens wurden alle Erkennungssignale

kartiert. Deshalb kann auf eine weitere Ausführung der Ermittlung aller in Abbildung 30 gezeigten Schnittstellen verzichtet werden. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die ermittelten Erkennungssignale nur unvollständig sind: Weitere Bgl II Stellen zwischen dem linken Eco RI und dem linken Bgl II Ort werden mit dieser Methode nicht erfaßt. (Für diesen Bereich steht keine Sonde zur Verfügung.)

Die Restriktionskarte (Abbildung 30) der drei untersuchten Loci zeigt zunächst, daß die Klon A und B Sequenzen mindestens 20 kbp von einander getrennt im Genom vorliegen, weil keine überlappende Identität von Restriktionsenzym-schnittstellen innerhalb der kartierten Bereiche erkennbar ist. Somit kann ausgeschlossen werden, daß die RNAs von Klon A und B analog den Retroviren Splicingprodukte einer Geneinheit darstellen.

Weiter ist ersichtlich, daß die LTR-ähnliche Sequenz nur einmal im Genom vorliegt. (Alle Verdaus mit Restriktionsenzymen, die nicht innerhalb dieser Sequenz schneiden, erzeugen im Southern Blot nur eine Bande.) Diese Sequenz flankiert somit keine Gene, wie dies für integrierte Proviren zutrifft. Es muß jedoch eingeräumt werden, daß diese als "inverted repeat" vorliegen könnte, wie dies z.B. bei Pflanzen- und Bakterien-Transposons beobachtet wird, und wodurch sie in einer Southern Blot Analyse nicht nachweisbar ist.

3.3.9 Die Sequenzen von Klon A und B sind in der Evolution hoch konserviert.

Frühere Arbeiten zeigen, daß alle untersuchten Vertebraten Retrovirale Elemente während der Embryogenese exprimieren

(vergleiche Einleitung). Durch das Postulat einer möglichen physiologischen Rolle dieser Partikel liegt die Vermutung nahe, daß den partikelspezifischen Nukleinsäuren ebenfalls eine funktionelle Bedeutung zukommt. Daraus kann gefolgert werden, daß die entsprechenden Gene einem gewissen Selektionsdruck in der Evolution ausgesetzt sind, was wiederum eine Konservierung dieser Sequenz wahrscheinlich macht.

Im Experiment wurden die chromosomalen DNAs von Huhn, Fasan, japanischer Wachtel, Maus und Mensch in Southern Blot Experimenten unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Abbildung 31 zeigt, daß unter stringenten Bedingungen die LTR-ähnliche Sequenz im Genom aller untersuchten Vögel nachweisbar ist. Sie liegt ebenfalls als einzelne Kopie vor. Unter nicht stringenten Bedingungen können auch positive Signale mit menschlicher DNA beobachtet werden. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß unter diesen Bedingungen in den DNAs der Vögel weitere Banden beobachtet werden, die unter stringenten Bedingungen nicht aufleuchten.

Da es sich bei Klon A um eine LTR-ähnliche Sequenz handelt, liegt somit der Verdacht nahe, daß unter diesen Bedingungen retrovirale oder Transposon LTR-Sequenzen detektiert werden. Dies stellt somit den positiven Befund mit der Maus- und der menschlichen DNA in Frage.

Abbildung 32 zeigt das gleiche Experiment unter nicht stringenten Bedingungen mit Klon B. Auch diese Sequenz ist in der Evolution konserviert, wobei bezüglich der Spezifität mit menschlicher DNA das gleiche gilt, was für Klon A beschrieben wurde. Unter stringenten Bedingungen erwiesen sich - wie bei Klon A - nur die DNAs der untersuchten Vögel als positiv (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund von Proteinsequenzdatenvergleichen fand nach vorsichtigen Schätzungen eine Trennung des Huhns von der

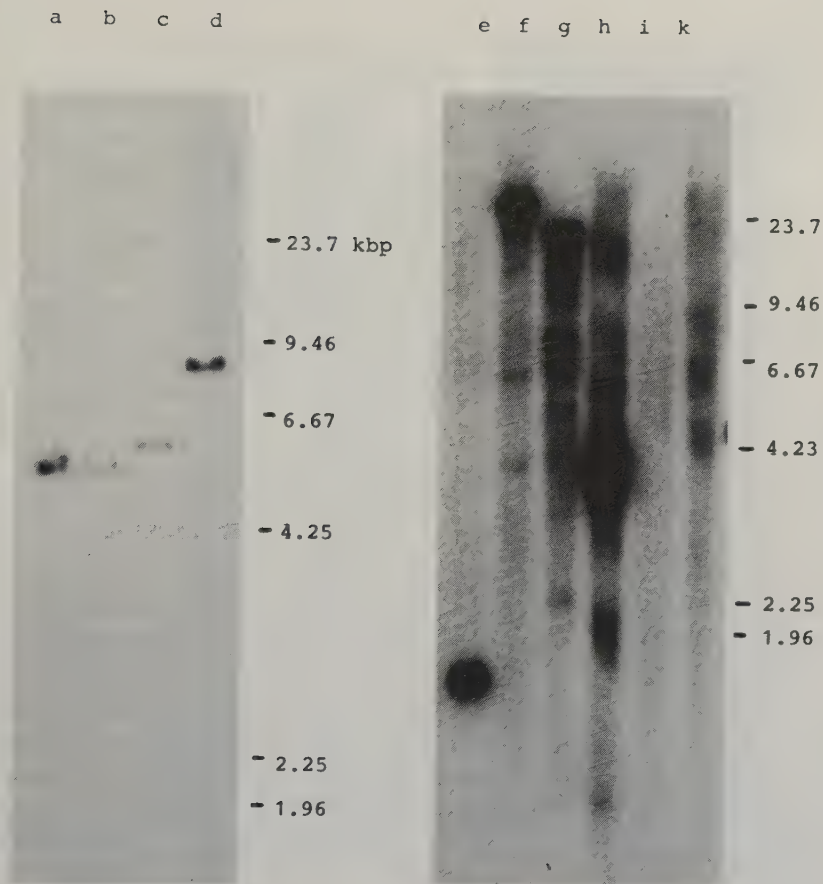


Abbildung 31: Southern Blot Analyse chromosomaler DNAs verschiedener Spezies hybridisiert mit Klon A; a) Ente; b) Japanische Wachtel; c) Fasan; d) Huhn; Hybridisierung unter stringenten Bedingungen (siehe Methoden), alle Proben wurden mit dem Enzym Sst I verdaut; e) Huhn, f) Fasan, g) Japanische Wachtel, h) Ente, i) Maus, k) Mensch; Hybridisierung unter nicht stringenten Bedingungen, alle DNAs wurden mit dem Enzym Hind III verdaut.

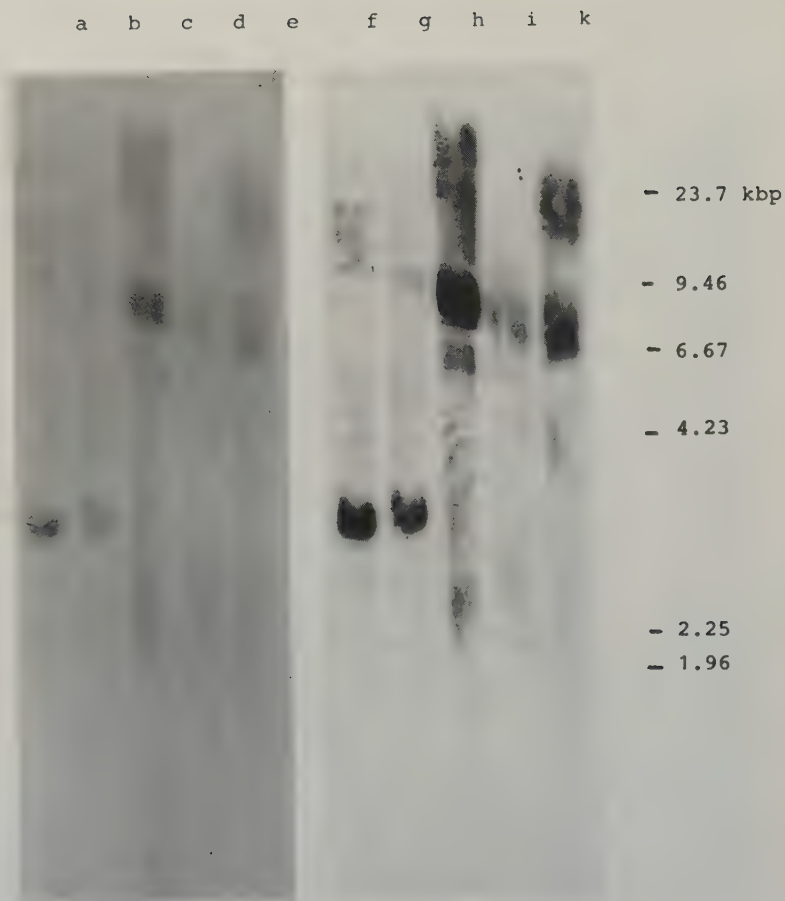


Abbildung 32: Southern Blot Analyse chromosomaler DNAs verschiedener Spezies hybridisiert mit Klon B; a) Fasan, b) Japanische Wachtel c) Ente, d) Maus, e) Mensch; Alle DNAs wurden mit dem Enzym Eco RI verdaut, Hybridisierung unter nicht stringenten Bedingungen, eintägige Exposition des Röntgenfilms. f-k) wie a-e nach dreitägiger Exposition des Röntgenfilms;

Ente vor ca. 60 bis 80 Millionen Jahren in der Evolution statt. Die hohe Konservierung der vorliegenden Sequenzen über einen so langen Zeitraum legt somit die Schlußfolgerung nahe, daß diesen überwiegend nicht kodierenden Basenfolgen eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden muß.

Es sei noch angemerkt, daß endogene RAV-0 Sequenzen nur bei sehr nahen Verwandten des Huhns (z.B. Fasan) nachweisbar sind. Damit unterscheiden sich die Partikel-RNAs in einem weiteren Punkt von den Retroviren.

3.3.10 Handelt es sich bei den Retroviralen Elementen um Vertebraten-Transposons?

Alle in der Literatur beschriebenen Transposons liegen im Genom der untersuchten Spezies in hoher Kopienzahl vor, während die RVE-RNA-Gene nur als einzelne Kopien nachweisbar sind. Obwohl insofern eine Transposonaktivität der RVEs als unwahrscheinlich eingestuft werden muß, kann aufgrund der organspezifischen Expression dennoch die Hypothese formuliert werden, daß durch die Transposition neuer DNA-Kopien der RVE-RNA in spezifische Stellen des Genoms die Zelldifferenzierung in bestimmte Bahnen gelenkt wird. In diesem Fall müßte gefordert werden, daß alle ausdifferenzierten Zellen eines bestimmten Zelltyps (z.B. Hepatozyten) mehrere Kopien des RVE-Genoms an definierten Orten tragen, die von dem Keimzell-Locus verschieden sind.

Diese Hypothese läßt sich wiederum durch Southern Analysen überprüfen. Für das Experiment wurden aus den Organen eines erwachsenen Huhns (Herz, Leber, Niere, Lunge, Muskel, Ovar) die chromosomalen DNAs isoliert und nach Southern analysiert.

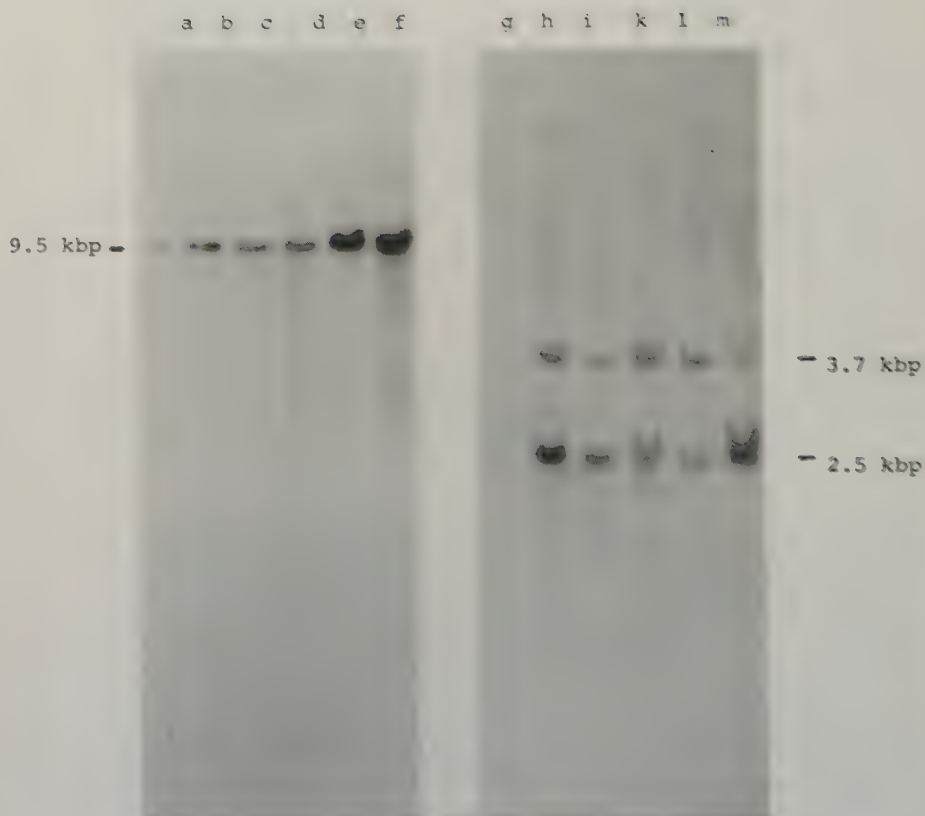


Abbildung 33: Southern Blot Analyse chromosomaler DNAs verschiedener Organe des Huhns hybridisiert mit Klon A (a-f) und Klon B (g-m); a) Muskel-DNA b) Ovar-DNA c) Herz-DNA d) Leber-DNA e) Lungen-DNA f) Nieren DNA; Alle DNA-Proben wurden mit dem Enzym Sst I verdaut; g-m) wie a-f, Verdau der DNA-Proben mit Hind III.

Wie Abbildung 33 zeigt, können jedoch weder für Klon A noch für Klon B zusätzliche Banden in diesen organspezifischen DNA-Proben nachgewiesen werden. Damit kann also eine Transposonaktivität als "Weichensteller" für die Organdifferenzierung gemäß obiger Hypothese ausgeschlossen werden. Im Falle von wenigen Integrationsereignissen an nicht "vorprogrammierten" Stellen des Genoms liegt jedoch eine mögliche Transposonaktivität unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode. Jedoch sollten bei "unprogrammierten" Transpositionen im Laufe der Evolution auch die Keimzellen davon betroffen werden, was wiederum zur Anhäufung dieser Gene im Genom führen würde. Dies ist jedoch nicht der Fall.

3.3.11 Klon B: "Nachbar" eines chromosomalen Neuordnungsereignisses

Die Restriktionsenzymkartierung (Abbildung 30) der beiden Loci von Klon B zeigt, daß alle ermittelten Schnittstellen links dieser Genorte identisch sind, während sie sich rechts davon vollkommen voneinander unterscheiden. Damit kann davon ausgegangen werden, daß Klon B ebenfalls als einzelne Kopie im Genom vorliegt, und daß das Auftreten von zwei Banden im Southern Blot die Folge einer Sequenzheterogenität ca. 500 bp rechts von diesem Gen darstellt.

Dies bedeutet also, daß Tiere, in deren Genom zwei Banden beobachtet werden, unterschiedliche Allele auf den väterlichen und mütterlichem Chromosomen tragen. Im Einklang mit dieser Aussage steht der Befund, daß für die Enzyme Eco RI, Pst I und Pvu II (Pst und Pvu sind in der Karte nicht gezeigt) auch bei heterozygoten Tieren im Southern Blot nur ein Signal beobachtet wird, dessen Intensität in der Autoradiographie gleich groß ist wie die Summe der Signale der zwei Banden bei Wahl eines anderen Enzyms (Ab-

bildung 34).

Untersuchungen an der Keimzell-DNA von zwei weiteren Hähnen und an der DNA isoliert aus 6 einzelnen 10 Tage alten Embryos zeigen, daß sowohl der eine wie der andere Genort im homozygotem Zustand vererbt werden kann (Abbildung 35). Dieser Befund machte - wie bereits erwähnt - die detaillierte Erstellung von Restriktionsenzymkarten beider Loci möglich.

Bei genauer Betrachtung der Southern Blot Analyse dieser Sequenz mit organspezifischen DNA-Proben (Abbildung 32) fiel mir auf, daß in der Ovar- und in der Nieren-DNA die beiden Banden unterschiedliche Intensitäten aufweisen, während die zwei Signale z.B. in der Lungen-DNA gleichstark aufleuchten.

Nachdem weitere Southern Experimente mit anderen Restriktionsenzymen (Bgl II, Hpa I, Sst I, Hae III) diesen Befund bestätigten und damit einen experimentellen Artefakt ausschlossen (Abb. 36, Daten nicht gezeigt), war damit der erste Hinweis auf ein gezieltes chromosomales Neuordnungsereignis gegeben.

Weitere Southern Experimente bestätigen diese Hypothese. Abbildung 36 zeigt das Ergebnis dieser Studien mit der Keimzell-DNA eines weiteren Hahns und der gesamt-DNA eines Embryos. In diesen Individuen ist der vermutlich ursprünglich homozygote Zustand durch eine Umstrukturierung des genetischen Materials partiell verloren gegangen, wobei das zweite beschriebene Allel in ca. 10%iger Häufigkeit vorliegt.

Aus diesem Ergebnis können folgende Schlußfolgerungen abgeleitet werden:

- Es handelt sich hier um ein sehr spezifisches chromosomales Neuordnungsereignis. Unterschiedlich lange

ABBILDUNG 34

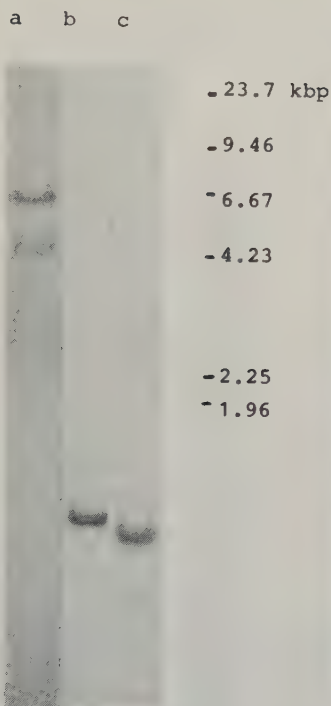


ABBILDUNG 35

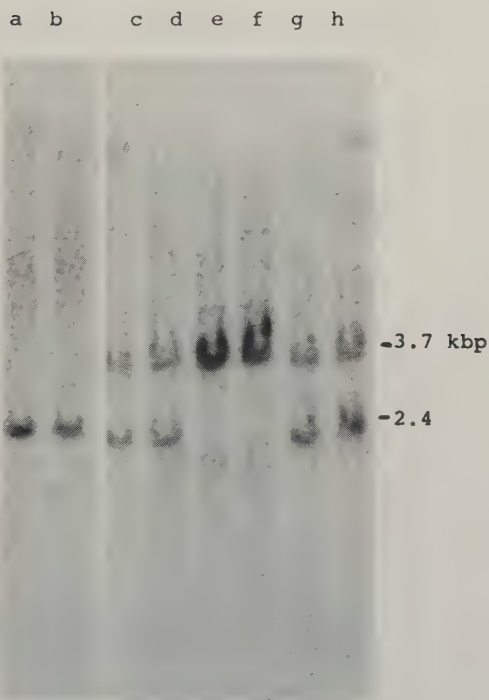


Abbildung 34: Southern Blot Analyse der chromosomalen DNA eines Huhns hybridisiert mit Klon B; DNA verdaut mit a) Hpa I b) Pvu II c) Pst I.

Abbildung 35: Southern Blot Analyse mit Hind III verdauter chromosomaler DNAs verschiedener Hühner-Individuen; Hybridisierung mit Klon B; a,b) Keimzell-DNA aus zwei verschiedenen Hähnen c-h) gesamt DNA isoliert aus 6 verschiedenen 10 Tage alten Embryos.

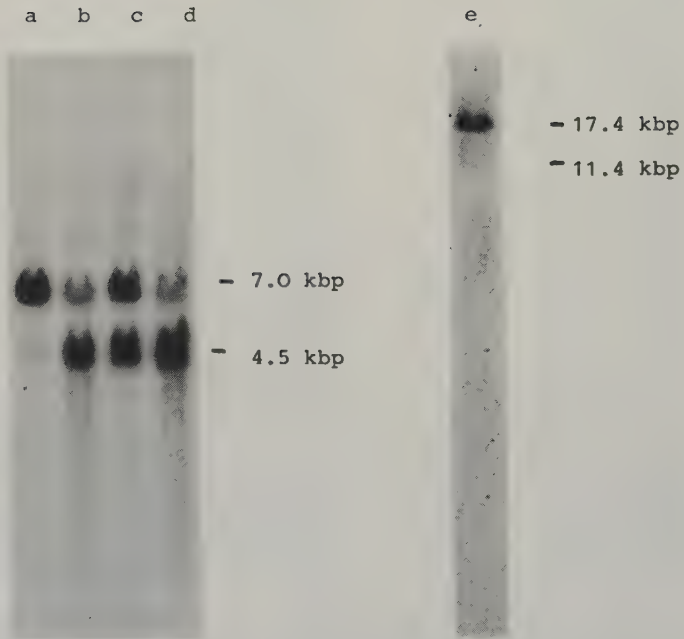


Abbildung 36: Southern Blot Analyse chromosomaler DNAs aus verschiedenen Hühnerindividuen hybridisiert mit Klon B; a) Keimzell-DNA eines Hahns b) Ovar-DNA eines Huhns c) Lungen-DNA d) Nieren-DNA; b-d sind identisch mit dem Tier in Abb. 33, die DNA-Proben wurden mit dem Enzym Hpa I verdaut. e) Gesamt-DNA eines Embryos verdaut mit Sst I.

Deletionen oder Inversionen würden eine Vielzahl von Sequenzunterschieden und damit eine Vielzahl von Banden im Southern Blot mit Klon B als Sonde nach ziehen.

- Das Neuordnungsereignis ist für die Ontogenese ohne Bedeutung. In diesem Fall müßten alle Individuen in gleichem Maße davon betroffen sein. Daher muß eine Signifikanz dieses Phänomens für die Evolution postuliert werden.
- Als möglicher Mechanismus scheidet eine Deletion aus, weil diese irreversibel ist. Dadurch wäre mit Sicherheit dieser bestimmte Genabschnitt im Laufe der Evolution verloren gegangen. Als weitere Alternativen kämen eine gezielte (revertierbare) Inversion eines Genabschnittes oder die Integration bzw. Exzision eines Transposons in Betracht.

Eine Antwort auf diese offene Frage kann die Klonierung und Analyse der chromosomalen Abschnitte beider Allele bringen.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die retrovirusähnlichen Partikel untersucht, die 1976 erstmals von Dr. G. Bauer beschrieben worden sind (Bauer und Hofschneider, 1976). Die hier gezeigten Daten bestätigen, daß es sich bei dem mit diesen Partikel assoziiertem Enzym um eine Reverse Transkriptase handelt. Durch die Methode des simultanen Nachweistests und durch Gelelektrophorese gelang erstmals der Nachweis, daß diese Partikel ebenfalls eine hochmolekulare RNA (50S) enthalten.

Hybridisierungsexperimente mit einer cDNA dieser RNA zeigen zunächst, daß diese zwar retrovirusverwandte Nukleotidsequenzen enthält (ca. 20% Homologie zu AMV-RNA), aber nicht mit dem bekannten endogenen Hühnerretrovirus RAV-0 identisch ist. Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen von Mondal, der ein ähnliches Verwandtschaftsverhältnis der RVE-RNA der Partikel der Japanischen Wachtel mit retroviralen RNAs fand (Mondal und Hofschneider, 1980).

Die molekulare Klonierung einer cDNA dieser RNA sollte klären, ob diese zellulären oder viralen Ursprungs ist. Die Klonierung erwies sich jedoch wegen der geringen Mengen an verfügbarer RNA als äußerst schwierig. Durch die Anwendung HPLC gereinigter Vektoren und Linkermolekülen gelang es schließlich, mit der Methode von Okayama und Berg eine cDNA in Bakterien zu amplifizieren.

4.1 HPLC - eine alternative Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren

Trotz enormer Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie mittels gentechnologischer Methoden stellt die Reinigung von DNA-Fragmenten noch immer ein nicht unerhebliches Problem dar. Diese erfolgt fast ausschließlich via Gelelektrophorese. Daraus resultieren meist mit Agarose verunreinigte Proben, mit denen nur schwer Manipulationen mit DNA oder RNA modifizierenden Enzymen durchführbar sind. Wie die Standardisierung der Klonierungsprozedur darlegt, müssen solche Verunreinigungen auch als Ursache der erfolglosen Anwendung der beschriebenen Klonierungsmethode mit gelelektrophoretisch gereinigten Nukleinsäuren interpretiert werden.

Die vorliegenden Daten mit HPLC gereinigten Vektor- und Linke-DNAs zeigen, daß eine chromatographische Trennung eine bedeutende Alternative zur Gelelektrophorese darstellt. Neben dem Vorteil der völligen Reinheit der isolierten Substanzen weist diese Methode keine nennenswerten Verluste des zu reinigenden Materials auf. Zudem ist sie schnell - eine Trennung dauert nur wenige Stunden - und ohne technische Schwierigkeiten durchführbar.

Obwohl augenblicklich die Anwendung der HPLC zur Trennung von Nukleinsäuren durch die Größe der DNA-Fragmente limitiert ist (Trennungen sind nur bis 400 bp möglich), steht zu erwarten, daß die Entwicklung von neuem Säulenmaterial (sterische Ausschlußchromatographie oder Ionenaustauscher) weitere Möglichkeiten der Reinigung auch bei äußerst geringen Mengen an DNA und RNA beliebigen Molekulargewichts eröffnet.

4.2 Charakterisierung der RVE-cDNA Klone

Die molekulare Klonierung einer cDNA der RVE-RNA resultierte in 2 Klonen mit je einer Insertlänge von ca. 450 bp. Diese Klone, mit A und B bezeichnet, stammen von zwei unterschiedlichen 25S mRNAs des Huhns, die beide mit den Kernstrukturen der Partikel assoziiert sind.

Die nachgewiesenen Homologien beider Klone zu AMV-RNA machten es zunächst wahrscheinlich, daß die RVE-RNAs unterschiedliche Splicingprodukte einer Geneinheit darstellen, wie dies für Transkriptionsprodukte integrierter Proviren zutrifft. Wie die Restriktionskartierung auf chromosomaler Ebene zeigt, liegen die entsprechenden Gene der klonierten Sequenzen im Hühnergenom als einzelne Kopien vor und sind mindestens 20 kbp von einander getrennt.

Einen Überraschenden Befund liefert die Lokalisierung der LTR-ähnlichen Sequenz. Sie ist als einzelne Kopie vorhanden und flankiert somit keine Gene, wie dies für integrierte Proviren und Transposons zutrifft. Es muß jedoch eingeräumt werden, daß diese LTR-ähnliche Struktur im Gegensatz zu den Retroviren invertiert, das heißt als "Inverted Repeat" vorliegen könnte, wodurch sie im Southern Blot nicht nachweisbar ist. Inverted Repeats sind bei Bakterien und Pflanzentransposons beschrieben (Review: Keckner, 1981; Freeling, 1984), doch sind sie nicht mit Reverser Transkriptase assoziiert. Da weder für Klon A noch für Klon B eine Transposonaktivität nachzuweisen war, kann diese Möglichkeit als unwahrscheinlich eingestuft werden. Gegen eine Transposonfunktion spricht zusätzlich der Befund, daß alle beweglichen Elemente in hoher Kopienzahl im Genom vorliegen.

Klon B zeigt geringe Sequenzhomologien (ca. 100 bp) zu der Sequenz des Klons A. Eine signifikante Homologie zu retroviralen oder Transposon LTRs liegt jedoch nicht vor. Weitere Cdemomputersequenzvergleiche enthüllen schwache Homologien zum AMV-Genom. Diese erstreckt sich auf wenige Nukleotide des Polgens (3'Ende) sowie über denjenigen Bereich, der zwischen dem Pol- und dem Mybgen liegt. Auf diesen Befund soll später noch einmal eingegangen werden.

Frühere Arbeiten zeigen eine Expression der retroviralen Elemente in allen untersuchten Spezies. Daher wurden die beiden klonierten Sequenzen mit den chromosomalen DNAs verschiedener Spezies hybridisiert. Die durchgeführten Experimente zeigen, daß beide Basenfolgen in der Evolution hoch konserviert sind. Dieser Befund kann als Hinweis auf eine spezifische und essentielle Funktion dieser Elemente gewertet werden. Unter nicht stringenten Hybridisierungsbedingungen können verwandte Sequenzen auch beim Menschen detektiert werden. Da bei den untersuchten Vögeln in diesem Fall jedoch zusätzliche Banden beobachtet werden, die unter stringenten Bedingungen nicht nachweisbar sind, muß die Spezifität der Signale mit menschlicher DNA vorerst mit Skepsis betrachtet werden.

Die vorliegenden Daten legen die Schlußfolgerung nahe, daß die RVE-RNAs als Dimer (2 x 25S) in den Partikeln vorliegt (50S RNA nach Gelelektrophorese unter nicht denaturierenden Bedingungen (Abb. 4); 25S RNA mit geringem Anteil 50S RNA (Abb. 19) nach Denaturierung mit Glyoxal). Es bleibt jedoch unklar, ob zwei verschiedene RNA-Moleküle ein Dimer formen, oder ob ein Dimer aus zwei identischen RNA-Molekülen besteht. Es stellt sich somit die Frage, in wieweit diese RNAs als partikelspezifisch eingestuft werden können; das heißt, werden in die Retroviralen Elemente wahllos RNAs einer bestimmten Größe (25S) eingepackt, oder liegen analog zu den Retroviren oder Ribosomen "organellspezifische" Nukleinsäuren vor?

Zusammenfassend können folgende Punkte für eine klare Befürwortung angegeben werden:

Im Falle von Klon A handelt es sich um eine in der Evolution hochkonservierte Sequenz, die als 25S sowie 50S RNA coreassoziiert ist. Sie besitzt eine LTR-ähnliche Struktur, wie sie bei allen mit Reverse Transkriptase-Partikeln assoziierten Nukleinsäuren gefunden wird. Die Hybridisierung dieser Sequenz mit der Partikel-RNA der japanischen Wachtel zeigte, daß in den Elementen dieser Spezies diese Sequenz ebenfalls auf einer 25S-RNA vorliegt (Mondal, unveröffentlichte Daten). Dieses spricht zudem in hohem Maße für eine Partikelspezifität. Für Klon B liegen diesbezüglich leider noch keine Resultate vor.

Diese Sequenz ist ebenfalls als 25S sowie 50S RNA coreassoziiert, in der Evolution konserviert und besitzt retrovirusähnliche Nukleotidsequenzen, die aber ebenso rein zufällig sein könnten, und deren biologische Bedeutung zumindest vorläufig unverstanden bleibt. Aufgrund des ersten Kriteriums kann dennoch die Frage der Partikelspezifität mit einem Ja beantwortet werden.

Obwohl gezeigt wurde, daß die klonierten Sequenzen auf genomischer Ebene mehr als 20 kb voneinander getrennt sind, kann dennoch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß beide Sequenzen auf einer 25S RNA vorliegen. Dies setzt die Präsenz eines Mosaikgens voraus, von dem zunächst eine Vorläufer-RNA translatiert wird, aus welcher wiederum durch Splicing die 25S RNA resultiert. Es sei darauf hingewiesen, daß die LTR-ähnliche Struktur die signifikantesten Homologien zum LTR des Copia-Elements 17.6 zeigt. Eine genaue Betrachtung der dem linken LTR folgenden Sequenz dieses Elements enthüllt ausgedehnte poly(A) Bereiche (Saigo et al. 1984). Sollte dies ebenfalls für die RVE-RNA zutreffen, muß eingeräumt werden, daß durch das Starten der cDNA-Synthese mit dem oligo(dT) des Vektors an einer solchen

Stelle das 5'Ende der RVE-RNA kloniert wurde und Klon A somit eine 5'LTR-ähnliche Struktur repräsentiert.

Eine eindeutige Antwort sollten elektronenmikroskopische Heteroduplexanalysen bringen. Doch zeigt die gereinigte RNA im Elektronenmikroskop sehr ausgeprägte Sekundärstrukturen, welche eine Hybridisierung der vorliegenden kurzen cDNA-Fragmente an diese RNA verhindert (Delius, persönliche Mitteilung). Die beobachteten homogenen Sekundärstrukturen liefern jedoch einen gesicherten Hinweis, daß die RVE-RNA aus einer homogenen RNA-Population besteht. So bleibt abzuwarten, ob die Klonierung langer Bereiche der genomischen DNA und weitere Sequenzdaten zu einer Beantwortung dieser Fragestellung führen.

4.3 Klon B - "Nachbar" einer Transposonaktivität?

Klon B zeigt mit den meisten untersuchten Individuen im Southern Blot 2 Banden, während bei einigen Tieren nur eine dieser Banden nachweisbar ist. Die Restriktionskartierung dieser beiden Loci auf chromosomaler Ebene liefert den überraschenden Befund, daß die Schnittstellen aller untersuchten Enzyme "links" der klonierten Sequenz identisch sind, während sie sich nach ca. 500 bp "rechts" völlig voneinander unterscheiden.

Dieser Befund läßt die Schlußfolgerung zu, daß es sich bei Klon B ebenfalls um ein "single copy" Gen handelt, und daß das Auftreten der beiden Banden die Folge der Sequenzheterogenität im Nachbarbereich darstellt. Die unterschiedlichen, jedoch spezifischen Restriktionsmuster definieren somit zwei unterschiedliche Allele (im folgenden mit I bzw. II

bezeichnet), die sowohl im homozygotem als auch heterozygotem Zustand in verschiedenen Tieren vorliegen. Sie werden also Mendelisch vererbt.

Wie weitere Southern Blot Experimente zeigen, weisen jedoch 3 untersuchte Individuen - entgegen den Mendelschen Regeln - eine ungleiche prozentuale Verteilung (90% Allel I; 10% Allel II) dieser beiden Allele auf. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, daß während der Embryogenese durch ein gezieltes und hochspezifisches chromosomales Neuordnungseignis ein ursprünglich homozygoter Zustand verloren geht und das zweite Allel "de novo" entsteht - also keinen parentalen Ursprung hat. Da diese Umstrukturierung ebenfalls die Keimzellen betrifft, kann ein Tier, das beispielsweise Allel I von beiden Elternteilen übernommen hat, Allel II an die Nachkommenschaft weiterreichen. Bei einer Kreuzung eines solchen "partiell" homozygoten Hahns (I/I) mit einer homozygoten Henne (II/II) müssen daher in der F₁ Population zu einem geringen prozentualen Anteil homozygote Individuen (II/II) erwartet werden. Dieser Befund zeigt somit eine Verletzung der Mendelschen Regeln auf molekularer Ebene.

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß solche definierten Allele in den anderen untersuchten Tierspezies (Fasan, Wachtel) ebenfalls beobachtet werden. Zwar wurden bei diesen Tierspezies keine detaillierten Restriktionskarten erstellt, doch legt die Konservierung der Eco RI-Schnittstelle außerhalb des klonierten Bereichs (Ein Southern Blot mit Eco RI verdauter Zellkern-DNA resultiert bei allen Spezies in nur einer Bande!) ein in der Evolution sehr altes Prinzip eines chromosomalen Neuordnungsmechanismus nahe.

Durch diese Daten scheidet als möglicher Mechanismus dieser Umstrukturierung eine (irreversible) Deletion von genetischem Material aus, da hierbei - statistischen Wahrscheinlichkeiten folgend - mit Sicherheit ein Allel im Laufe der

Evolution verloren gegangen wäre. Daher muß eine reversible Inversion eines chromosomalen Abschnittes oder - was eine äußerst lukrative Arbeitshypothese darstellt - eine Integration beziehungsweise Exzision eines Transposons in Betracht gezogen werden. Die zweite Hypothese soll im Zusammenhang mit der Evolution von Retroviren noch einmal aufgegriffen werden.

Eine mögliche Lösung dieser Frage könnte das "Herausfischen" langer chromosomaler Abschnitte beider Allele aus einer Genbibliothek und die Sequenzierung dieser unterschiedlichen Sequenzen bringen. Sollten in einem der beiden Allele ein Genabschnitt mit direkten oder invertierten Repeats gefunden werden, könnte dies als Nachweis des ersten Vertebraten-transposons angesehen werden!

4.4 RVE - ein zellulärer Reverse Transkriptaseapparat?

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten sowie frühere Ergebnisse zeigen eine Reihe von Unterschieden der beschriebenen Elemente zu Retroviren, die hier noch einmal zusammengefaßt werden sollen:

- (1) Die Partikel sind nicht infektiös und können nicht als Helferviren agieren (Bauer et al., 1977).
- (2) Die Expression ist streng mit der Organdifferenzierung korreliert und ist in ausdifferenzierten Geweben nicht mehr nachweisbar (Mondal et al. 1980, 1982, 1983).
- (3) Die Reverse Transkriptase ist immunologisch mit den

retroviralen Polymerasen nur wenig verwandt (Bauer et al., 1976, 1977, Mondal et al. 1980, 1982, 1983).

- (4) Die retroviralen Elemente enthalten möglicherweise zwei verschiedene 25 S RNAs, die beide nur geringe Sequenzhomologien zu retroviralen RNAs zeigen. (Als Alternative wurde das Vorliegen eines Mosaikgens diskutiert.) Die für diese RNA(s) kodierenden Bereiche liegen im Genom mindestens 20 kbp von einander getrennt als einzelne Kopien vor.
- (5) Es kann nur eine LTR-ähnliche Sequenz nachgewiesen werden, die somit keine Geneinheit flankiert, wie dies für integrierte Proviren zutrifft.
- (6) Die untersuchten Sequenzen sind in der Evolution hoch konserviert.

Aufgrund dieser Ergebnisse steht fest, daß die beschriebenen Partikel weder endogene Retroviren noch Transposons darstellen. Diese Befunde erlauben die Hypothese, daß es sich hier um einen zellulären Reverse Transkriptaseapparat handelt, der in der Ontogenese und in der Evolution eine physiologische Rolle spielt. Dabei kann folgendes Modell vorgeschlagen werden:

Zu frühen Stadien der Embryogenese werden die Gene der Elemente aktiviert und der Zelle eine Maschine zur reversen Transkription zur Verfügung gestellt. Während einer "Reifungsphase" der Zelldifferenzierung können durch die gezielte Umschreibung von zellulären RNAs in extrachromosomale DNA einzelne Gene transient amplifiziert oder genregulatorische DNA-Elemente erzeugt werden, die durch Reintegration in die chromosomale DNA Gene aktivieren oder diese abschalten können. Durch diesen Mechanismus kann es ebenfalls zu Ausbildung der bekannten intronlosen Pseudogene

kommen (vgl. unten).

Am Ende der Differenzierung wird die Reverse Transkriptionsmaschine nicht mehr benötigt. Möglicherweise würde sie sogar den normalen Betrieb der ausdifferenzierten Zelle stören und muß daher eliminiert werden. Da sich aber embryonale Zellen in einem raschen Turnus teilen, wäre - im Hinblick auf eine gut funktionierende Synthese aller zur Zellteilung notwendigen Substanzen - eine Eliminierung der Partikel durch Proteasen und Nukleasen sicherlich äußerst unvorteilhaft. Diese würden andere Proteine und RNAs ebenfalls zerstören.

Deshalb bedient sich der Organismus eines anderen Prinzips: Er entledigt sich des Apparats mit einem Budding- oder Knospungs-Prozesses, der auch als Mikroexocytose betrachtet werden kann. Dies ist der Grund, warum diese Elemente als retrovirusähnliche Partikel in extrazellulären Flüssigkeiten (Blut, Amnionflüssigkeit) gefunden werden.

In diese Hypothese fügt sich der Befund, daß die LTR-ähnliche Sequenz einen poly(U)-Anteil enthält, der mit dem poly(A) von mRNAs basenpaaren kann und somit ein erstes Signal der Interaktion zwischen Partikel und der zur Amplifikation vorgesehenen mRNA darstellen könnte. Doch reicht eine solche Interaktion sicherlich nicht aus, um eine gezielte, das heißt spezifische Anlagerung der zu amplifizierenden RNA an das dafür vorgesehene Organell zu gewährleisten.

Durch die Arbeiten von Zimmer et al. (Zimmer et al. 1982) ist bekannt, daß das Aktin während der Differenzierung bis zu 80fach amplifiziert wird. Falls eine Genamplifikation via Reverse Transkriptase vorliegen sollte, kann postuliert werden, daß für diesen Mechanismus weitere Kontroll- oder Signalsequenzen notwendig sind. Ein Computersequenzvergleich (Programm: Bestfit UWGCG) der invertierten komplementären Klon A Sequenz mit den publizierten Aktinsequenzen lieferte

das überraschendes Ergebnis, daß ca. 35 bp dieser mRNA mit einem Abschnitt der RVE-LTR-Sequenz basenpaaren kann.

Um auszuschließen, daß dieses Ergebnis rein zufälliger Natur ist, wurde diese ermittelte Konsensus-Sequenz mit 21 weiteren mRNAs des Huhns verglichen. Erstaunlicherweise findet man ähnliche Sequenzen nur bei wenigen weiteren RNAs, deren Gene jedoch entweder als Pseudogene im Genom vorliegen (U1), oder die als intronlose (also revers transkribierte) Gene in Tumoviren gefunden werden (myb, myc, src; = Onkogene). Zudem liegt diese Konsensus-Sequenz bei allen untersuchten RNAs ca. 30 bis 300 bp vor dem poly(A)-Tail dieser RNAs, was auf eine hohe Signifikanz dieses Befundes hinweist. Die unten gezeigte Abbildung soll dieses Resultat verdeutlichen. Ein * markiert hierbei eine exakte Basenpaarung, ein o gibt eine mögliche Purin-Pyrimidinpaarung (G-U oder A-C) wieder.

KlonA 3'GUCCAGACGUGUACUAUAUGTACAUUUUUACCAUGAUGUGUUAAG 5'

```

AKTIN   *  o* * ***o oo* ** * * ****o****o**** * * *
C-MYC   *  ***o**oo*o * ** * o***** ooo** ** * o *
C-MYB           **** **o * *o ** * **** *o * * ****
C-SRC   *  ***o**oooo* o *      oooo oo* ****o*****o * **
MYOSIN  *  ** oo o      * o*****o***o * **o*** ****
U1      *  **** *oo o *o*** ** o o*** ** ****

```

Für die weiteren untersuchten mRNAs (Insulin, Pyruvatkinase, Tubulin, Ovomuroid, Serumalbumin usw) liegen keine signifikanten Homologien vor. Es könnte sich also bei dieser Sequenz um ein "Signal" zur gezielten Selektion bestimmter RNAs handeln. Dieses Postulat setzt natürlich voraus, daß diese durch den Computer ermittelte Sequenz an der Oberfläche der Cores der Partikel liegt, und somit diese (hypothetische) Interaktion ermöglicht. Eine Klärung könnte eventuell die Hybridisierung einer radioaktiv markierten, zur Signalstruktur komplementären Sequenz an die Cores und eine anschließende Analyse in einem Saccharose Dichtegra-

dienten liefern (Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung).

4.5 Eine Reverse Transkriptionsmaschine - ein Vorteil für Organismus und Evolution?

Für einen Organismus und für die Evolution stellt ein reverser Transkriptase Apparat ein wertvolles Werkzeug aus folgenden Gründen dar:

- (1) Es besteht die Möglichkeit, Gene während der Embryonalentwicklung gezielt zu amplifizieren, das heißt, ein bestimmtes Genprodukt zur gewünschten Zeit in großer Menge verfügbar zu machen (siehe oben).
- (2) Durch Reintegration extrachromosomal amplifizierter Nukleotidsequenzen in das Genom zu frühen Zeiten der Embryogenese ist die Möglichkeit gegeben, funktionelle Gene oder Genabschnitte zu amplifizieren, und ihnen nach Reintegration in die Zellkern-DNA durch Mutationen eine neue Spezifikation zuzuordnen. Ebenso besteht die Möglichkeit, genregulatorische Elemente zu erzeugen und diese als An- oder Abschaltungssignale vor oder in kodierende Sequenzen zu setzen.

In den letzten Jahren mehren sich die Berichte von intronlosen Pseudogenen, die nur durch reverse Transkription der entsprechenden mRNAs und durch Reintegration in das Genom entstanden sein können. So wurden z.B. für Hämoglobin (Vanin et al. 1980), U-RNAs (Denison et al. 1981, Ohshima et al. 1981), und für Immunglobuline (Bentley et al. 1980) Pseudogene beschrieben.

Im Zusammenhang mit den Retroviralen Elementen erscheinen die Alu-Sequenzen von besonderem Interesse, die eindeutig als Pseudogene der 7S-RNA identifiziert werden konnten (Ullu und Tschudi, 1984). Die 7S-RNA ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der die Signalsequenz von Membran- und extrazellulären Proteinen erkennt, und die an den Ribosomen naszierende Polypeptidkette durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums transportiert (Walter und Blobel, 1982). Die Sequenz dieser nicht kodogenen RNA ist in der Evolution hoch konserviert, wobei zwischen den Insekten- und menschlichen Genen ca. 70% Sequenzhomologien gefunden werden (Ullu und Tschudi, 1984), die sich über die gesamte Länge dieser RNA erstrecken.

Die 7SL-RNA unterscheidet sich von den Alu-Sequenzen im wesentlichen nur durch ein 155 bp langes Insert, das von ca. 100 bp am 3' und 45 bp der Alu-Sequenz am 5' Ende flankiert wird. Aus dieser Perspektive können also Alu-Sequenzen als defektive 7SL-Gene betrachtet werden. Während Alu-Sequenzen in den Genomen von Säugern als repetitive Sequenzen auftreten, konnten bisher keine derartigen Gene bei Insekten nachgewiesen werden (Review: Jelinek and Schmid, 1982; Sharp, 1983; Brown, 1984).

Dieser Befund legt die Schlußfolgerung nahe, daß die Evolution der Alusequenzen nach der Trennung von Vertebraten und Chordaten durch Amplifizierung einer prozessierten 7SL-RNA stattfand. Die 7SL-RNA wurde erstmals in Retroviruspartikeln gefunden (Bishop et al., 1970). Daher wurde eine Vervielfältigung über reverse Transkription postuliert. Für diesen Mechanismus der Amplifikation durch reverse Transkription spricht weiter der Befund, daß integrierte Alu-Sequenzen von 7 bis 20 bp langen "Direct Repeats" flankiert werden. Eine Duplikation von kurzen Bereichen der Ziel-DNA ist ein Phänomen, das bei vielen nachgewiesenen Integrationsvorgängen von extrachromosomaler DNA (Transposons, Proviren, intronlose Pseudogene!) beobachtet wird. Es

bleibt noch hinzuzufügen, daß Alu-Sequenzen in vivo von der RNA-Polymerase III transkribiert werden (Young et al. 1982), wobei diese Transkripte wiederum ein Template für die RT darstellen könnten (Review: Jagadeeswaren et al. 1981).

Nach meiner Meinung erscheint jedoch eine Amplifikation durch das Hilfsmittel "Parasit Retrovirus" eher unwahrscheinlich und unnötig, da gezeigt werden konnte, daß alle in diesem Labor untersuchten Vetebraten über eine eigene Reverse Transkriptase verfügen, die auch im Zellkern als freies wie partikelgebundenes Enzym nachgewiesen werden kann (Mondal, 1983). Zwar verfügen Insekten ebenfalls über eine RT (z.B. RT bei Copia in Drosophila (Shiba und Saigo, 1983)), doch scheint für einen solchen Prozess ein komplexeres Organell notwendig zu sein, wie sie die retroviralen Elemente vermutlich darstellen.

4.6 Retrovirale Elemente, Evolution und die Protovirus-hypothese

Aus der Beobachtung, daß die beschriebene LTR-ähnliche RVE-Sequenz im Hühnergenom als einzige Kopie vorliegt, kann eine attraktive Hypothese zur Evolution von Transposons, Intrazisternalen A-Partikeln und Retroviren abgeleitet werden, die sich wie folgt in die von Temin vorgeschlagene Protovirushypothese einfügen läßt (Vergleiche Abbildung 38)

Während der Evolution entwickelte sich zunächst aus IS-Elementen eine LTR-ähnliche Sequenz, die Steuerungssignale zur Genregulation enthielt. Noch ehe sich das Tierreich in Chordaten und Vertebraten teilte, erfand die Natur ein Enzym, das wie oben erläutert einen Fortschritt für

Differenzierung und Evolution darstellt: Die Reverse Transkriptase. Durch Flankierung dieses Gens mit LTR-Sequenzen entstanden Copia ähnliche Elemente. Es sei an dieser Stelle nochmals an das beschriebene chromosomale Neuordnungsereignis erinnert. Es kann an dieser Stelle spekuliert werden, daß das RVE-RNA-Gen (Klon B) möglicherweise bestimmte Erkennungssignale für eine Transposonintegration benachbart und gemäß der Protovirushypothese im Laufe der Evolution von Transposons aufgegriffen wurde. Die beobachtete Sequenzhomologie mit dem AMV-Genom (Homologien zum Nachbarbereich des Polgens!) macht diese Annahme zu einer äußerst lukrativen Arbeitshypothese.

Die Kombination LTR plus Reverse Transkriptase ermöglicht es, diese Elemente via reverse Transkription zu amplifizieren, sie vor "unerprobte, brachliegende", potentiell jedoch kodogene DNA-Sequenzen zu setzen, und somit neue Genprodukte "auszuprobieren". Andererseits können durch Integration in einen kodogenen Abschnitt Gene inaktiviert werden. Dies trifft noch heute für Transposons zu (Reviews: Green, 1981, Freeling, 1984).

In diese Hypothese fügt sich der Befund, daß das Transposon Copia von *Drosophila* transkribiert wird und die resultierende RNA in Partikeln mit diesem Enzym assoziiert nachgewiesen werden kann (Shiba und Saigo, 1983). Einer russischen Arbeitsgruppe gelang es kürzlich zu zeigen, daß diese RNA wiederum in DNA umgeschrieben wird (Arkhipova et al. 1984). Somit könnten Copia-Elemente als "konservierte Nachfahren" dieser Entwicklungsstufe gewertet werden.

Im weiteren Verlauf der Evolution könnte unabhängig von der Evolution der Copia-Elemente die Verbindung RT und LTR-"Ursequenz" in folgender Weise erweitert und modifiziert worden sein: Durch Mutation einer solchen Regulatorsequenz und Aufbau eines Organells, wird der Zelle ein Apparat zur Verfügung gestellt, der im Gegensatz zu den Transposons

nicht die eigene, sondern gezielt "fremde" RNAs revers transkribieren kann. Es soll an dieser Stelle - darauf hingewiesen werden, daß das Detergenz NP40 die Reverse Transkriptase aus der Corestruktur der RVEs löst, während dies für Retroviren nicht zutrifft. Daraus kann geschlossen werden, daß - im Gegensatz zu den RNA-Tumroviren - dieses Enzym an der Oberfläche der Corestruktur lokalisiert und damit zellulären RNAs zugänglich ist.

Dieser zelluläre Reverse Transkriptase Apparat ermöglicht zum einen die rasche Evolution von repetitiven DNA-Elementen (z.B. Alu-Elemente), und vermag zum anderen zelluläre mRNAs für eine transiente Genamplifikation in DNA umzuschreiben. Wie durch zahlreiche Beispiele mit repetitiver DNA in der Literatur belegt ist, muß dieser Schritt nach Beginn der Vertebratenevolution stattgefunden haben.

Die LTR-Sequenz könnte dabei die Rolle der Selektion der RNA, sowie Funktionen bei Steuerungsvorgängen der Enzymreaktion übernommen haben. Als Hinweis darauf soll die Poly(U)- und die postulierte Signal-Sequenz genannt werden, die erste Erkennungssignale Partikel - poly(A)-RNA darstellen könnten. Für diese Funktion genügt sicherlich eine einzige genomische DNA-Kopie der LTR-ähnlichen Sequenz. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen.

Man kann sich nun vorstellen, daß nach Umschreibung einer Strukturprotein-mRNA (sp) in intronlose extrachromosomale DNA eine Rekombination dieser DNA mit Copia-Elementen stattfindet. Die daraus resultierende Einheit LTR-sp-pol-LTR könnte nun Vorläufer der intrazisternalen A-Partikel und der Retroviren gewesen sein. Vermutlich ging während dieser Entwicklungsstufe die 3'AT-reiche Region bei diesen Elementen verloren, während sie bei den Copia-Elementen und den RVEs erhalten blieb.

Durch Mutation, Deletion und weitere Rekombinationsereig-

nisse entstanden schließlich IAPs und Retroviren. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, können also RNA-Tumoviren als Entgleisungsprodukte eines physiologischen Evolutionsprozesses gewertet werden.

Untersuchungen vieler Autoren haben gezeigt, daß Retroviren besonders dazu neigen, mit zellulären Genen (Onkogenen!) zu rekombinieren. Durch die maligne Transformation (z.B. durch Retroviren) werden differenzierte Zellen "dedifferenziert", wodurch möglicherweise eine Reaktivierung der RVE-Gene stattfindet. Diese Partikel wiederum könnten via reverse Transkription exprimierter Protoonkogene (Signalsequenz!) zur Entstehung rekombinanter Retroviren mit integrierten, intronlosen Onkogenen beigetragen haben. Zur Unterstützung dieser Theorie sei erwähnt, daß verschiedene Antiseren gegen die AMV-RT zur unterschiedlichen Inaktivierung der RVE-RT führen, was Bauer als Verunreinigung der zur Immunisierung verwendeten AMV-RT mit Partikel-RT interpretierte (Bauer, 1976)!

Für das geschilderte Evolutionsmodell spricht der Befund, daß die RVE-LTR-Sequenz mit Transposon- und IAP-LTRs bessere Homologien zeigt als zu retroviralen RNAs. Den Computersequenzvergleichdaten folgend, muß davon ausgegangen werden, daß sich RVE- und IAP-LTRs unabhängig aus einer gemeinsamen "LTR-Ursequenz" entwickelten. Im Falle einer kontinuierlichen Entwicklung $Copia \rightarrow RVE \rightarrow IAP$ sollten gemeinsame Mutationsereignisse bei zwei Elementen (also RVE und IAP) beobachtet werden, die sie gegen das dritte Element (Copia) abgrenzen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Während sowohl die hochspezialisierte RVE-LTR-Sequenz als auch die Transposon-LTRs dem Prinzip der natürlichen Selektion unterworfen sind (keine intakte RVE-LTR-Sequenz - kein funktionierender RT-Apparat; keine intakten LTRs keine Transposon-Funktion), ist es Retroviren erlaubt, Mutationen in höherem Maße in ihren LTRs zuzulassen, solange die

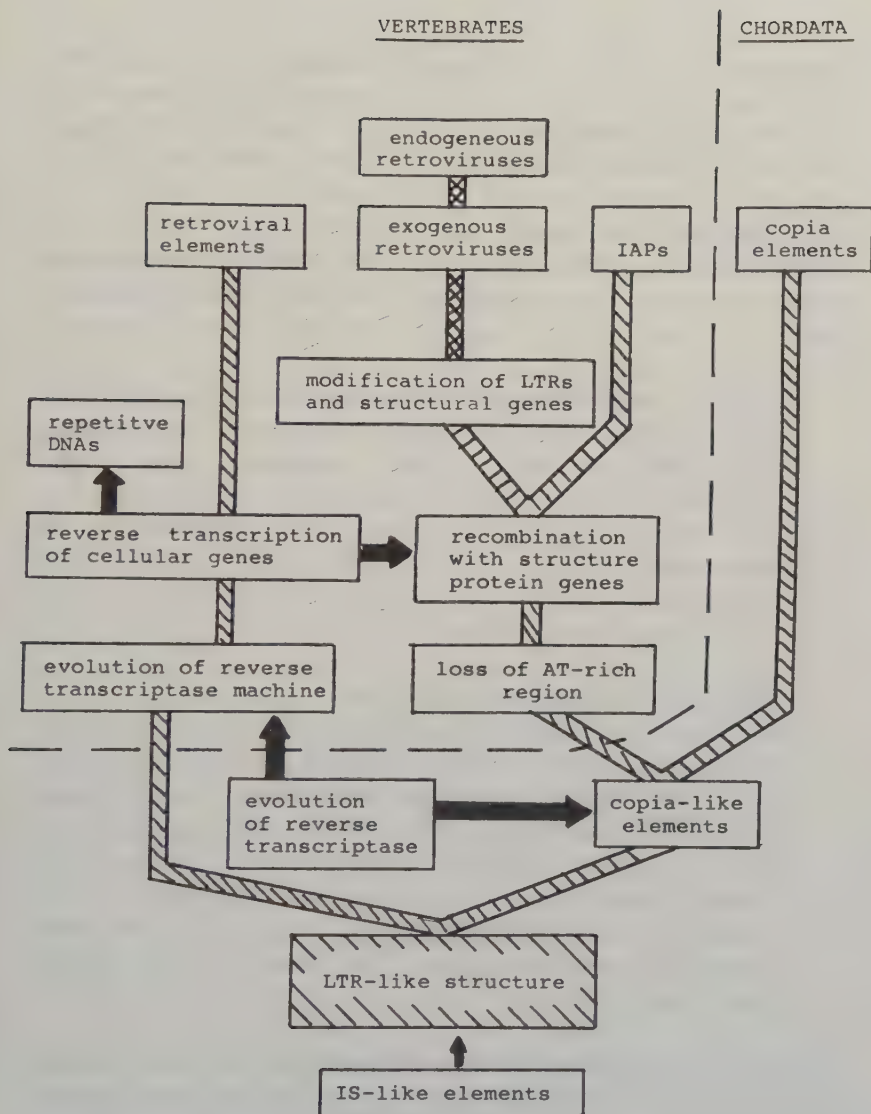


Abbildung 37: Modell zur Evolution von Retroviren, Transposons und Retroviraler Elemente. Erklärungen siehe Text.

Selbstreplikation in gutem Maße funktioniert. Es darf hier sogar gefordert werden, daß eine Reihe weiterer LTR-Mutationen zu dem "egoistischen" Verhalten dieser selbstständig gewordenen Gene beigetragen hat.

Nach diesem Modell werden also LTR-Sequenzen und Reverse Transkriptase zur Entwicklung von zwei voneinander unabhängigen, völlig unterschiedlichen physiologischen Prozessen genutzt. Dieses ist für eine Zelle von folgenden Vorteilen:

- Während der Embryogenese können bestimmte Gene via RVE transient amplifiziert werden. Die daraus resultierenden extrachromosomalen DNAs besitzen keine LTRs, wodurch deren Reintegration nur sehr selten stattfindet. Damit wird eine Anhäufung von Pseudogenen im Genom weitgehend verhindert. Für diesen Apparat genügt ein einziges Gen pro Komponente, deren Expression sehr spezifisch steuerbar ist.
- Andererseits besteht durch die Aktivierung eines Reverse Transkriptase Transposons - das nur die eigene RNA revers zu transkribieren vermag - keine Gefahr, die fein regulierte Expression zellulärer Gene durch unkontrollierte Genamplifikation aus dem Gleichgewicht zu heben. Durch Transpositionereignisse liegen viele Kopien dieser Elemente im Genom vor. Die Aktivierung eines oder mehrerer Elemente kann mit unterschiedlichen Gengruppen gekoppelt werden und bedarf daher keiner zentralen Steuerung.

In wieweit sich diese Hypothesen überprüfen lassen, bleibt sicherlich für lange Zeit offen. Für einen gemeinsamen Ursprung und eine voneinander unabhängige Evolution von RVE, IAP und Transposons aus einer "LTR-Ursequenz" sprechen zunächst nur die auffallenden Gemeinsamkeiten der LTRs. Eine weitere Klärung bringen möglicherweise weitere Sequenzdaten der gesamten, für die Partikel-RNAs und Proteine kodierenden

Gene.

Sollten weitere Ergebnisse das Postulat bestätigen, daß es sich bei dem beschriebenen Retroviralen Element um einen zellulären Reverse Transkriptase Apparat handelt, schlage ich vor, diesen als "Reversom" zu bezeichnen, um ihn als embryonales Zellorganell zur reversen Transkription spezifischer RNAs zu klassifizieren.

5. MATERIAL

Eier:

Die befruchteten, virusfreien Hühnereier stammten von der Lohmann-Tierzucht Cuxhaven.

Serum und Medium:

DMEM wurde von der Firma SEROMED, fötales Kälberserum je nach Angebot von den Firmen BOEHRINGER, SEROMED oder GIBCO bezogen. Die für die Bakterienkultur verwendeten Substanzen (Hefeextrakt und Bacto-Pepton) waren Produkte der Firma Bacto.

Antibiotika:

Für die Gewebekultur wurde Streptomycin der Firma SEROMED und Penicillin der Firma HOECHST verwendet. Chloramphenicol, Tetracyclin und Penicillin für Bakterienkulturen stammten von der Firma Sigma.

Radioaktive Substanzen:

Die in dieser Arbeit verwendeten radioaktiven Substanzen wurden von der Firma NEN (New England Nuclear) oder von Amersham Buchler geliefert.

Enzyme, Nukleotide und Nukleinsäuren:

AMV Reverse Transkriptase:	Dr. Berd, Life Sci. Inc.
E. coli DNA-Polymerase I (Nicktranslationen):	Fa. Boehringer
E.coli DNA-Polymerase Kleenow-Fragment:	Fa. NEN
E.coli DNA-Polymerase (Klonierung):	Fa. NEN
E.coli Ribonuclease H:	Fa. P.L. Biochem.
E.coli DNA-Ligase:	Fa. P.L. Biochem.
T4 Ligase:	Fa. BRL
S1-Endonuklease:	Fa. Boehringer
Desoxyribonuklease (DNase):	Fa. Boehringer
Ribonuclease A aus Pankreas:	Fa. Boehringer
Terminale Transferase:	Fa. P.L. Biochem.
Lysozym	Fa. Sigma
BSA (Rinderserumalbumin):	Fa. BRL
Proteinase K:	Fa. Boehringer
dGTP, dCTP, dATP, dTTP:	Fa. Boehringer
p(C)(dG)12:	Fa. Boehringer
λ -DNA:	Fa. Boehringer
E.coli tRNA:	Fa. Boehringer
poly rA(40-60):	Fa. P.L. Biochem.
oligo dA-Sepharose:	Fa. P.L. Biochem.
oligo dC-Sepharose:	Fa. P.L. Biochem.
SV40 - DNA:	Fa. BRL

Restriktionsenzyme: Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden je nach Angebot von den Firmen Boehringer Mannheim, BRL, oder P.L. Biochem. gekauft.

Chemikalien:

Saccharose (RNase-frei):	Fa. Schwarz/Mann
NP 40:	Fa. FLUKA
SDS:	Fa. Serva
DTT:	Boehringer Mannheim
Triton X-100	Fa. Sigma

Sonstiges:

Agarose:	Fa. Sea-Kear
Nitrozellulosefilter:	Firma Schleicher und Schüll

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von der Firma MERCK bezogen.

Mit RAV-0-Viren infizierte embryonale Wachtelzellen waren ein Geschenk von Prof. Dr. R. Friis der Universität Gießen.

6. METHODEN

6.1 Bebrütung der Eier

Die befruchteten Hühnereier wurden sofort nach der Lieferung in einem Inkubator bei 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50% 12 Tage bebrütet, wobei sie durch die Wendeautomatik im Abstand von 4 Stunden um ihre Längsachse gedreht wurden.

6.2 Isolierung der RT-Partikel aus der Amnionflüssigkeit

Nachdem die Eier nach der Bebrütung mindestens eine Stunde im Kühlraum standen, wurden sie mit einer Pinzette am stumpfen Ende vorsichtig geöffnet und die Amnionflüssigkeit mit einer Spritze abgesaugt. Nach einer mitteltourigen Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C in einem SS34 Rotor für 15 Minuten (Entfernung von Zellen, Zellkernen und Mitochondrien von abgestorbenen Zellen) wurden die RT-Partikel durch Ultrazentrifugation 90 Minuten bei 25000 rpm und 4°C in einem SW27 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 0,2 ml TNE-Puffer suspendiert und diese Suspension über einen linearen Saccharosegradienten

(10 bis 50% (w/w) in TNE-Puffer pH 7,4) geschichtet, der mit Hilfe eines zweikammerigen Mischgerätes geformt worden war. Die Zentrifugation des Gradienten fand in einem SW41 Rotor bei 38000 rpm und 4°C für 18 Stunden statt.

Nach dieser Zentrifugation wurde der Gradient vom Boden in ca. 0,4 ml Fraktionen ausgetropft und von jeder Fraktion ein Enzymtest auf Aktivität der Reversen Transkriptase durchgeführt (vgl. 5.4).

6.3 Isolierung von RAV-0-Viren

Die Isolierung von RAV-0-Viren fand aus den Gewebekultur-überständen von embryonalen Wachtelzellen statt, die mit diesen Viren infiziert worden waren.

6.3.1 Gewebekultur

Die infizierten Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) gezogen und bei 37°C so lange inkubiert, bis durch Kontaktinhibition kein Zellwachstum mehr möglich war. Das Medium enthielt 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat und 10% fötales Kälberserum, welches 30 Minuten bei 56°C inaktiviert worden war. Das Medium wurde im Abstand von zwei Tagen gewechselt und bis zur Weiterverarbeitung nach Abzentrifugation von Zellen und Zellbestandteilen bei 10000 rpm und 4°C in einem SS34 Rotor bei -70°C gelagert.

Das Passagieren der Zellen erfolgte folgendermaßen: Die Zellen wurden mit PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ ad 1l) gewaschen und mit einem minimalen Volumen Trypsinlösung (0,25%) überschichtet, 5 bis 10

Minuten bei 37°C inkubiert, in Medium aufgenommen und auf einer größeren Oberfläche ausgesät.

6.3.2 Virusreinigung

Die Reinigung der Viren erfolgte unter den gleichen Bedingungen, die für die Anreicherung der RT-Partikel (5.3) beschrieben ist.

6.4 Standardansatz für die Aktivitätsbestimmung von Partikel gebundener Reversen Transkriptase

Zum Nachweis des Enzyms Reverse Transkriptase genügte es in den meisten Fällen, die Enzymaktivität mit dem synthetischen Homopolymer-Template-Primer-Komplex $p(C)(dG)_{12}$ zu demonstrieren, der als spezifisch für dieses Enzym gilt (Samgadhara, M.G., 1972).

Ein Enzymansatz mit dem Volumen von 100 μ l enthielt:

Tris-HCl pH 8,2	50 mmol/l
KCl	50 mmol/l
Dithioerythritol	10 mmol/l
Magnesiumacetat	10 mmol/l
Nonidet P40	0,1% (v/v)
Rinderserumalbumin	50 μ g
3H dGTP (26 Ci/mmol/l)	5 μ Ci
$p(C)(dG)_{12}$	2 μ g

Die Inkubation erfolgte jeweils für 30 Minuten bei 37°C. Der

Einbau von $^3\text{HdGTP}$ in poly(dG) wurde durch Bestimmung der Radioaktivität in TCA unlösliches Material bestimmt (siehe 5.6).

6.5 Simultaner Nachweis von RT-Aktivität und einer hochmolekularen RNA

Für den Nachweis einer hochmolekularen RNA und Enzymaktivität der Reversen Transkriptase wurde der gleiche Reaktionsansatz wie zur Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase mit p(C)(dG)_{12} verwendet, wobei anstelle dieses Template-Primer-Komplexes $(\text{dT})_{12}$ zugegeben wurde, das mit dem poly(rA)-Ende der Partikel-RNA basenpaaren kann, und somit einen Primer für die Reverse Transkriptase liefert.

Ein Ansatz mit dem Volumen von 100 μl enthielt:

Tris-HCl (pH 8,2)	50 mmol/l
DTT	10 mmol/l
KCl	12 mmol/l
Nonidet P40	0,1 % (v/v)
oligo(dT)	12,5 $\mu\text{g/ml}$
MgCl_2	35 mmol/l
$^3\text{HdGTP}$ (40mCi/mmol)	2 mmol/l
dGTP	8 mmol/l
dCTP	10 mmol/l
dATP	10 mmol/l
dTTP	10 mmol/l
Aktinimycin D	50 $\mu\text{g/ml}$

Die zweistündige Inkubation erfolgte bei 42°C . Danach wurde

der Ansatz auf eine Endkonzentration von 10 mmol/l EDTA, 250 mmol/l NaCl und 1% SDS eingestellt, mit Proteinase K eine Stunde bei 37°C inkubiert (vgl. 5.9.1), die Nukleinsäuren mit Phenol ausgeschüttelt (5.9.2) und schließlich die verbliebenen organischen Lösungsmittel durch zweimaliges Ausschütteln mit Diethylether entfernt. Die wässrige Phase konnte nun über einen linearen Saccharosegradienten (10-30% in TNE-Puffer) geschichtet, und für 3,5 Stunden bei 38000 rpm und 4°C zentrifugiert werden.

Nach dieser Zentrifugation wurde das Röhrchen vom Boden in ca. 0,3 ml Fraktionen ausgetropft, und von jeder Fraktion die säurefällbare Radioaktivität bestimmt. Dazu war es erforderlich, zuvor BSA bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zuzugeben, um die Nukleinsäuren mit Trichloressigsäure quantitativ präzipitieren zu können.

6.6 Radioaktivitätsmessungen

Für die Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität wurden 100 µl Testlösung mit 1 ml 10%iger Trichloressigsäure (=TCA), die 1% Pyrophosphat enthielt, versetzt, und 30 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben durch Nitrozellulosefilter mit der Porengröße von 0,6 µm filtriert und mit mindestens 30 ml eisgekühlter 5%iger TCA, die wiederum 1% Pyrophosphat enthielt, nachgewaschen. Nach einer 25 minütigen Trocknung der Filter bei 90 bis 100°C konnte die Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt werden.

Als Szintillationsreagenz für die auf den Filtern präzipitierte Radioaktivität diente Xylofluor der Firma J.T. Baker.

Für Szintillationszählungen wässriger Proben wurde Aquasol 2 der Firma New England Nuclear verwendet.

Die zu messenden Impulse pro Zeit wurden in einem Szintillationsphotospektrometer vom Typ "Nuclear Chicago Mark II" bestimmt.

6.7 Extraktion von DNA und RNA

Benötigte Puffer:

HB-Puffer (Homogenisierungspuffer)

Tris-HCl (pH 7,4)	10 mmol/l
EDTA (pH 7,4)	0,1 mmol/l
NaCl	10 mmol/l
DDT	1 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l

TEN⁺-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mmol/l
EDTA (pH 8,0)	1 mmol/l
NaCl	250 mmol/l

TE-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mmol/l
EDTA (pH 8,0)	1 mmol/l

6.7.1 Präparation von Zellkernen

Die Zellkerne wurden aus verschiedenen Organen der Hühnerembryos oder aus dem Gewebe ganzer Embryos isoliert. Dazu wurden die Gewebeteile in einer Laborzentrifuge bei 1500 Upm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Naßgewicht der Gewebeteile bestimmt. Eine Zugabe von 10 ml HB-Puffer pro 3 g Gewebe und 10 bis 15 maliges Douncen in einem Homogenisator mit einem Pestill mit großem Spiel zerstörte die Gewebeverbände und brachte die Einzelzellen fast quantitativ zum Platzen, was unter einem Mikroskop nachweisbar war.

Dieses Zellhomogenat wurde nun zunächst bei 4°C und 500 rpm 5 Minuten lang in einer Laborzentrifuge zentrifugiert, um noch unzerstörte Zellen sowie verbliebene Gewebeteile zu entfernen. Aus dem Überstand konnten durch eine weitere Zentrifugation bei 2000 bis 2500 rpm für 10 Minuten die Zellkerne sedimentiert werden.

Der Niederschlag dieser Zentrifugation wurde noch zweimal durch vorsichtiges Resuspendieren in TEN^+ -Puffer und anschließender Zentrifugation bei 2000 Upm gewaschen, das Pellet der letzten Zentrifugation in 10 ml TEN^+ -Puffer pro 3g Gewebe aufgenommen, um wie unter 5.7.2-3 beschrieben die Nukleinsäuren zu extrahieren.

6.7.2 Verdauung der Proteinanteile mit Proteinase K

Um Proteine aus der nukleinsäurehaltigen Lösung zu entfernen, wurde der Ansatz (z.B. Suspension von Zellkernen in TEN^+ -Puffer) auf eine Endkonzentration von 1% Natriumdodecylsulfat (=SDS) gebracht, anschließend Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugegeben, und, wie jeweils erforderlich, 3 bis 12 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Proteinase K Lösung (10mg/ml in

TE-Puffer) war zuvor bei 37°C 2 Stunden selbstverdaut worden.

6.7.3 Phenolextraktion

Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer mit TE-Puffer gesättigten Lösung aus Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (50:50:2) versetzt, und 15 Minuten (im Falle hochmolekularer chromosomaler DNA 45 Minuten) auf einem Rotationsmischer bei langsamer Geschwindigkeit gedreht. Nach anschliessender Zentrifugation für 10 Minuten in einer Laborzentrifuge bei 3000 Upm und Zimmertemperatur konnte die wässrige Phase vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen werden.

Bei der Isolierung der Nukleinsäuren aus Partikeln wurde die Phenolphase nochmals mit dem gleichen Volumen TE-Puffer versetzt, wie oben beschrieben verfahren, und danach die beiden wässrigen Phasen vereinigt.

Um die Nukleinsäuren von noch verbliebenen Peptiden und Lipiden weiter zu reinigen, wurde die beschriebene Extraktion noch zweimal wiederholt. Die wässrige Phase der letzten Extraktion mußte nun auf 0,25 M Kaliumacetat (pH 7,0) gebracht werden, um die Nukleinsäuren durch Zugabe des 2,5fachen Volumens absoluten Ethanol über Nacht quantitativ präzipitieren zu können.

Für weitere Arbeiten wurde der Niederschlag in einem SW HB4 Rotor mindestens 10 Minuten bei 10 000 Upm und -10°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in TE-Puffer gelöst, und nach Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren (siehe 5.8) entweder sofort weiterverarbeitet oder in kleinen Portionen wie oben mit Ethanol gefällt und so bei -20°C (RNA bei -70°C) gelagert.

6.8 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung eignet sich die Lichtabsorption dieser Moleküle bei 260 nm. Die Messungen fanden in Quarzküvetten in einem Beckmann Spektralphotometer statt, wobei die nukleinsäurehaltige Lösung mit dem entsprechenden Puffer als Leerwert verglichen wird. Hierbei ist die Absorption einer reinen DNA bzw. RNA-Lösung bei 260 nm doppelt so groß wie bei 280 nm, was als Kriterium der Reinheit der Probe herangezogen werden kann, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Eine Absorption von einer optischen Dichte (=1 OD) bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg DNA bzw. von 42 µg RNA pro ml Lösung (Maniatis et al., 1981).

6.9 DNA-RNA und DNA-DNA Hybridisierung in flüssigem Medium

Die Reaktionsmischung für die Hybridisierung von DNA mit RNA enthielt:

NaCl	0,6	mol/l
EDTA pH 8,0	1	mmol/l
SDS	0,1	% (w/v)

Dabei kann mit der Konzentration der DNA bzw. der RNA variiert werden. Die Experimente fanden in Eppendorfgefäßen statt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Der Ansatz wurde, um die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zu trennen 10

Minuten bei 100°C und anschließend für die gewünschte Zeit zur Bildung der DNA-RNA bzw. DNA-DNA Hybride in einem Wasserbad bei 65°C inkubiert (Melli, M., et al., 1971).

6.10 Reaktionen mit DNA und RNA modifizierenden Enzymen

6.10.1 Herstellung einer zur RNA komplementären DNA (cDNA)

Die cDNA-Synthese (Reaktionsvolumen 10 µl) fand bei 42°C für 35 Minuten unter folgenden Bedingungen statt:

Tris-HCl pH 8,2	50	mmol/l
DTT	10	mmol/l
KCl	30	mmol/l
MgCl ₂	7	mMol/l
Oligo dT bzw. 10-15 bp		
ssKalbsthymus-DNA	10	µg/ml
dATP	2	mmol/l
dTTP	2	mmol/l
dGTP	2	mmol/l
dCTP	1	mmol/l
³ HdCTP (20 Ci/mMol)	0,1	µmol/l
AMV-Reverse Transkriptase	1000	U/ml

Die Ausbeute an cDNA kann - unter der Annahme, alle 4 Basen seien im äquimolarem Verhältnis in der RNA vorhanden - nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{ng cDNA} = \frac{1,32 \text{ dX}}{\text{nY}}$$

1,32: Konstante resultierend aus dem durchschnittlichem Molekulargewicht der Nukleotide

d: Verdünnungsfaktor mmol dNTP/mmol radioaktiven dNTP

X: cpm der cDNA

n: Anzahl der eingesetzten radioaktiven Nukleotide

Y: $Y = C_i \times C_e / 1000$

C_i : Ci/mmol des Nukleotidtriphosphats (vom Hersteller angegeben)

C_e : Zählausbeute des Zählers (cpm/ μ Ci)

Um den RNA-Anteil nach der cDNA-Synthese zu entfernen, wurde der Ansatz mit 0,1 M NaOH 30 Minuten bei 70 °C inkubiert, und anschließend mit 0,1 M Essigsäure neutralisiert.

6.10.2 Nicktranslation

Ein Standardansatz für die Nicktranslation enthielt:

Tris-HCl pH 8,0	40 mmol/l
DTT	4 mmol/l
MgCl ₂	5 mmol/l
dATP	50 μ mol/l
dCTP	50 μ mol/l
dGTP	50 μ mol/l
³ HdCTP (50 mCi/mmol)	10 μ mol/l

oder

$^{32}\text{PdCTP}$ (4000 Ci/mmol) 2 $\mu\text{mol/l}$

Ein Versuchsansatz enthielt 15 μl obiger Mischung und wurde auf eine Endkonzentration von 0,2 pg DNase und 2 Einheiten E.coli DNA-Polymerase I (Kornberg-Enzym) eingestellt. Die Inkubation fand für 2 bis 3 Stunden bei 19°C statt.

Unter diesen Bedingungen entstehen unter der Wirkung der DNase Einzelstrangbrüche in der doppelsträngigen DNA. Diese "Nicks" werden von der Polymerase erkannt, die nun an diesen Stellen einen Teil des gebrochenen DNA-Einzelstranges abbaut (5'→3' Richtung), und diesen durch den Einbau neuer Nukleotide ersetzt, wobei der komplementäre Strang als Matrice dient. Da im Testansatz ein Nukleotid radioaktiv markiert ist, erhält man nach Ablauf der Reaktion DNA-Moleküle, in die radioaktive Nukleotide eingebaut worden sind (Rigby, P.W.J. et al., 1977).

6.10.3 Terminale Transferase

Ein Reaktionsansatz enthielt:

Cacodylsäure-Tris-HCl	pH 6,8	
Tris		30 mmol
Cacodylsäure		140 mmol
CoCl ₂		1 mmol
DTT		0,5 mmol
dNTP		
T-tailing	dTTP	0,2 mmol
G-tailing	dGTP	0,1 mmol
C-tailing	dCTP	0,1 mmol
Terminale Transferase		0,5 -1 U/pmol 1kbp DNA

Berechnung der Länge der Tails:

Die Anzahl der angehängten NMPs kann mit folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Anzahl der NMP/Ende} = \frac{\text{pmol Nukleotid inkorporiert}}{\text{pmol DNA eingesetzt} \times 2F}$$

F = Anzahl der DNA-Fragmente im Ansatz

Die Menge (in pmol) eingebautes Nukleotid berechnet sich wie folgt:

$$\text{pmol ink.} = \frac{\text{gesamt CPM der Probe}}{\text{CI} \times \text{CE}} \times 1000\text{nd}$$

n = Anzahl der radioaktiven Nukleotide (in der Regel n=1)

d = Verdünnungsfaktor kalte/heiße Nukleotide

CI = Ci/mmol Nukleotid (ist vom Hersteller angegeben)

CE = Counting efficiency / μCi Nukleotid

(im Nuklear Chicago: ^3H = 600 000 cpm/ μCi)

^{32}P = 1 000 000 cpm/ μCi)

Die Anzahl pmol DNA der eingesetzten Probe berechnet sich:

$$\text{pmol DNA} = \frac{\text{eingesetzte } \mu\text{g DNA}}{\text{Länge der DNA (kbp)} \times 0,66}$$

6.10.4 Verdau einzelsträngiger Nukleinsäuren mit S1-Endonuklease

Die Reaktionsmischung für den Verdau einzelsträngiger Nukleinsäuren mit S1-Endonuklease enthielt:

Natriumacetat pH 4,5	250 mmol/l
Zinksulfat	10 mmol/l
S1- Endonuklease	50 Einheiten / ml

Da dieses Enzym als Nebenreaktion in sehr geringem Ausmaß auch doppelsträngige DNA und DNA-RNA-Hybride abbauen kann, wurde dem Ansatz 5µg/ml doppelsträngige DNA sowie 20 µg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA zugegeben, um durch Substratvermehrung diesen Nebeneffekt des Enzyms auf die Probe zu verringern. Zu einer Hybridisierungsprobe wurde das 10fache Volumen obiger Mischung gegeben, und die Reaktion bei 45°C 90 bis 120 Minuten lang durchgeführt (Young, E.T., und Sinsheimer, R.L. 1965).

6.10.5 Ligierung von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase

Der Reaktionsansatz (20 µl) für die Reaktion mit DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 enthielt:

Tris-HCl pH 7.6	50 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
DTT	1 mmol/l
ATP	1 mmol/l
BSA	50 µg/ml

Für die Ligierung von Restriktionsenzym geschnittenen DNA-Fragmenten wurde die Reaktion bei 20°C (Raumtemperatur) 2 Stunden, für die für die Ligierung "stumpfer Enden" über

Nacht durchgeführt (Weiss, B. et al. 1968). Bei Verwendung von DNA-Ligase aus E.coli, die β NAD als Coenzym benötigt, wurden folgende Bedingungen gewählt (Okayama und Berg, 1982):

Tris-HCl	pH 7,5	20 mmol/l
MgCl ₂		4 mmol/l
(NH ₄) ₂ SO ₄		10 mmol/l
KCl		100 mmol/l
β NAD		0,1 mmol/l
BSA		50 μ g/ml

6.10.6 Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen

Volumen und Reaktionszeit der Ansätze hängen von der DNA-Konzentration und der eingestetzten Enzymmenge ab. Die Inkubationszeit der DNA-Proben betrug für alle Restriktionsenzyme mindestens 1 Stunde. Die Reaktion fand jeweils bei 37°C statt (Roberts, M., et al. 1976, Zabeau, M., und Roberts, R.J. 1979).

Für die Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen wurden vier Puffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen als 10x Konzentrat hergestellt, die mit Y0, Y50, Y100 und Y150 bezeichnet wurden. Die folgenden Angaben geben die Endkonzentration im Reaktionsansatz wieder. Bei allen Verdäusen wurde BSA bis zu einer Endkonzentration von 50 μ g/ml zugegeben.

Puffer	Tris-HCl	pH	NaCl	MgCl ₂	β -ME
Y0	10	7,7	-	10	5
Y50	10	7,7	50	10	7
Y100	10	7,7	100	10	7
Y150	10	7,7	150	10	7

Die Wahl des Puffers für ein bestimmtes Restriktionsenzym richtete sich nach der von der Herstellerfirma angegebenen optimalen Salzkonzentration.

6.11 Isolierung bakterieller Plasmide

6.11.1 Anlegen von Bakterienkulturen

Nährmedium für Bakterienkulturen

Bacto Pepton	10 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l

Je nach Bedarf wurde nach dem Autoklavieren Antibiotika bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

1 ml der Bakterienstammkultur wurde über Nacht in 100 ml Nährmedium bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden nun 10 ml dieser Bakterienkultur in 1 l Nährmedium transferiert, und nach Erreichen einer Bakteriendichte von 0,8 O.D./ml (650 nm) Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben, wodurch bei der anschließenden Inkubation über Nacht bei 37°C zwar die Plasmid-DNA, nicht aber die chromosomale DNA der Bakterien repliziert d.h. amplifiziert wird.

6.11.2 Plasmidisolierung

Benötigte Lösungen:

ST-Puffer:

Tris-HCl	pH 8,0	50 mmol/l
Saccharose		25 % (w/v)

TTE-Lösung:

Tris-HCl	pH 8,0	50 mmol/l
EDTA	pH 8,0	60 mmol/l
Triton 100		2 % (v/v)

Nach der Inkubation der Bakterien in Chloramphenicol enthaltenem Nährmedium wurden die Bakterien 10 Minuten bei 5000 rpm und 15°C in einem GSA-Rotor abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen, und die Bakterien in 10 ml ST-Puffer suspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte zunächst durch eine 5 minütige Inkubation nach Zugabe von 1,2 ml Lysozymlösung (5 mg/ml) und anschließender Beimengung von 4 ml EDTA-Puffer (250 mmol/l) und nach weiteren 5 Minuten durch 15 ml TTE-Lösung.

Dieses Gemisch wurde nach einer 15 minütigen Inkubation in Eis 1 Stunde lang bei 17000 rpm in einem SS34 Rotor zentrifugiert, um die hochmolekulare chromosomale DNA zu entfernen. Der Überstand konnte schließlich für die Zentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten herangezogen werden.

Dazu wurden 30 g CsCl in obigem Bakterienaufschluß gelöst und 3 ml einer Etidiumbromidlösung (10 mg/ml) beigegeben. Die Zentrifugation fand in einem Ti60 Rotor bei 15°C und 45000 rpm für mindestens 40 Stunden statt.

Danach wurde die im UV-Licht deutlich sichtbare Bande der Plasmid-DNA (unterhalb einer sehr dünnen Bande von chromosomaler DNA) mit einer Kanüle abgezapft, Etidiumbromid durch 3 maliges Ausschütteln mit Butanol/Oktanol (7:3), CsCl durch 3 malige Dialyse für jeweils eine Stunde gegen TE-Puffer (siehe 5.7) entfernt, und schließlich die DNA nach Phenolextraktion (5.7) durch Zugabe von 2,5 Volumenanteilen absolutem Ethanol gefällt (Radloff, R., et al., 1967).

6.12 Plasmidisolierung nach Birnboim

Benötigte Puffer:

1. Lysozym-Lösung:

Glucose	50 mmol/l
EDTA (pH 8,0)	10 mmol/l
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mmol/l
Lysozym	2 mg/ml

2. Alkalischer SDS-Puffer:

SDS	1 % (w/v)
NaOH	0,2 mol/l

3. Acetat-Puffer:

Natriumacetat	3 mol/l
mit Essigsäure auf pH 4,8 einstellen	

4. TS-Puffer

Natriumacetat	0,1 mol/l
---------------	-----------

Tris 50 mmol/l
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Für die Plasmidisolierung nach Birnboim (Birnboim 1979) wurden je 1,5 ml der Übernachtskultur in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und die Bakterien durch eine einminütige Zentrifugation in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 100 μ l Lysozymlösung suspendiert und so 30 Minuten in einem Eisbad stehen gelassen.

Anschließend wurde die Suspension mit 200 μ l der alkalischen SDS-Lösung versetzt, nach fünfminütiger Inkubation im Eisbad mit 170 μ l Acetat-Puffer neutralisiert, und weitere 60 Minuten im Eisbad stehen gelassen. Nach einer erneuten zweiminütigen Zentrifugation bei 4°C konnte schließlich der Plasmid enthaltende Überstand abgenommen, und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 ml absolutem Ethanol ausgefällt werden.

Das Präzipitat wurde nun 2 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Exsikkator 5 Minuten getrocknet. Zur weiteren Reinigung der Plasmid DNA eignete sich eine Aufnahme der getrockneten Nukleinsäuren in 100 μ l TS-Puffer und wiederholte Fällung mit 250 μ l absolutem Ethanol.

6.13 Gelelektrophorese in Agarose

Benötigte Puffer:

TPE-Puffer:

50 mol/l Tris
 10 mol/l EDTA
 33 mol/l NaH_2PO_4
 (ergibt pH 7,5)

Stop-Lösung:

5 mol/l Harnstoff
 10 mmol/l EDTA
 50% (w/v) Rohrzucker
 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Um DNA und RNA Moleküle nach ihrer Größe analytisch sowie präparativ zu trennen, eignet sich eine Elektrophorese in Agarose. Dazu wurde die Agarose in Phosphatpuffer suspendiert (1g/100ml = 1%) und unter ständigem Rühren ca. 1 Minute gekocht. Die heiße flüssige Lösung wurde nun in die horizontale Gelkammer gegossen, auf die ein "Kamm" gestellt worden war um die Schächte für den Auftrag der Proben freizulassen. Nachdem die Lösung erkaltet und das Gel polymerisiert war, wurde es noch mindestens 1 Stunde bei 4°C stehen gelassen.

Um die Proben (je 20 μl) in die Schächte einbringen zu können (Unterschichtung des bereits in den Schächten befindlichen Puffers), mußten sie mit 5 μl Stop-Lösung gemischt werden. Danach wurde eine Gleichstromspannung von 50-150 mV angelegt, wobei darauf geachtet werden muß, daß die Proben zur Anode wandern.

6.14 Southern Blot

Benötigte Puffer:

1. 20 x SSC-Puffer

Natriumcitrat	0,3 mol/l
NaCl	3 mol/l

2. Denaturierungspuffer

NaCl	1,5 mol/l
NaOH	0,5 mol/l

3. Neutralisierungspuffer

Tris-HCl (pH 7,0)	0,5 mol/l
NaCl	3 mol/l

4. 50 x Denhardts Lösung

Ficoll 400	1 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	1 "
BSA	1

5. Hybridisierungspuffer

Tris-HCl pH 7	10 mmol/l
EDTA	1 mmol/l
SDS	0,5 % (w/v)
5 x Denhardts Lösung	
5 x SSC	

Um DNA nach der Elektrophorese aus dem Gel auf Nitrocellulo-

se-Filter übertragen zu können, ist es zuerst notwendig, (i) hochmolekulare Fragmente zu "zerkleinern" und (ii) dsDNA in die beiden Einzelstränge zu trennen, da dsDNA nicht oder nur schlecht an Nitrocellulose bindet. Dies geschah (i) durch Inkubation mit 0,25 M HCl 15 Minuten lang und (ii) durch Inkubation des Agarose-Gels in Denaturierungspuffer für 30 Minuten wobei das Gel - wie auch bei der anschließenden Neutralisation (ca. 45 Minuten) - auf einem Schüttler ständig leicht im Puffer geschwenkt wurde.

Nun konnte das Gel auf die Blotvorrichtung (siehe Abbildung) gelegt werden, und der Transfer der DNA auf den Nitrozellulosefilter für mindestens 16 Stunden in 20 x SSC-Puffer erfolgen. Im Gegensatz zu der im allgemeinen verwendeten Glasplatte als Unterlage, wurde in den von mir durchgeführten Experimenten ein puffergetränktes Schaumstoffkissen verwendet, um einen gleichmäßigen und quantitativen Transfer auch bei großen Filtern zu gewährleisten. Anschließend wurde der Filter eine Stunde bei Zimmertemperatur getrocknet, danach die DNA 3 Stunden bei 80°C an den Filter "festgebacken".

Um unspezifische Bindungsstellen auf dem Filter abzusättigen, und damit ein hohes Hintergrundrauschen bei der späteren Autoradiographie zu vermeiden, wurde zunächst mit Lachsspermien-DNA (100 µg/ml Hybridisierungspuffer) mindestens 1 Stunde bei 60°C vorhybridisiert, und dann die Hybridisierung mit der ^{32}P -markierten DNA (5×10^7 - 10^8 cpm/µg DNA, mindestens 2×10^4 cpm/cm² Filter) bei 60°C durchgeführt.

Um die nicht hybridisierte radioaktive DNA zu entfernen, und um unspezifische Hybridisierungsprodukte zu zerstören, wurde nach der Hybridisierung der Filter einmal 15 Minuten mit 2 x SSC-Puffer bei Raumtemperatur und danach mit 0,2 x SSC zweimal für je 30 Minuten bei 60°C gewaschen. Der Filter wurde nun bei Zimmertemperatur eine Stunde getrocknet und

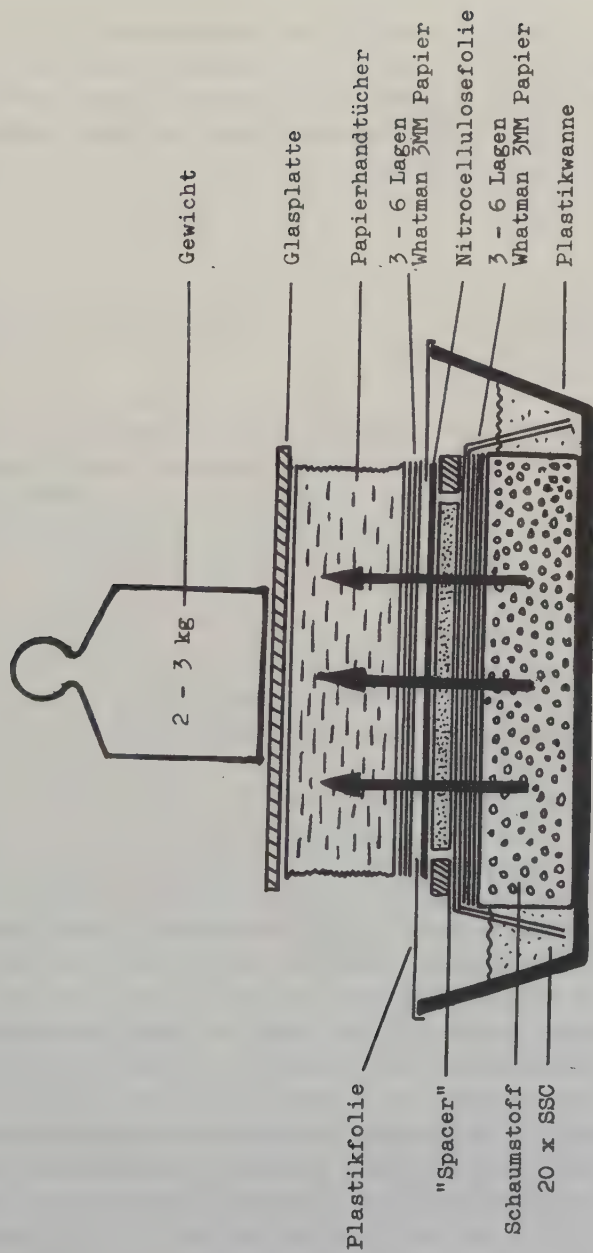


Abbildung 38: Southern Blot Apparatur, Erklärung siehe Text

schließlich eine Autoradiographie vorgenommen.

Für Southern Blot Analysen von chromosomaler DNA wurden pro Schlot ca. 30 µg chromosomale DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym verdaut.

6.15 Northern-Blot

Der Transfer von RNA auf DBM-Papier erfolgte im Wesentlichen wie der Transfer von DNA auf Nitrozellulose. Lediglich erfordert die Verwendung von DBM-Papier die Wahl anderer Puffer.

Benötigte Pufferlösungen:

1. 10 mg/ml NaNO_2
2. 1 mol/l NaAcetat pH 4,0
3. 10 mmol/l Naphosphatpuffer pH 6,5
4. Elektrophoresemix (22µl/RNA-Probe):
 - 15 µl DMSO
 - 0,6 µl Phosphatpuffer
 - 0,6 µl 10% SDS
 - 5,8 µl Glyoxal

Nach der Gelelektrophorese (8 µl RNA-Lösung werden zuvor mit 22 µl Elektrophoresemix gemischt und 15 Minuten bei 50°C erhitzt) in Lösung 3 wurde das Gel 10 Minuten in Lösung 2 geschwenkt und der Transfer wie bei der Prozedur nach Southern durchgeführt.

Da DBM-Papier nur kurze Zeit stabil bleibt, muß es kurz vor dem Experiment aus ABM durch Oxidation hergestellt werden. Dazu wird das ABM-Papier in verdünnte Salzsäure gelegt (9 ml konz. HCl ad 100 ml) und nach Zugabe von 2,7 ml Lösung 1

mindestens 1 Stunde im Eisbad bei gelegentlichem Schütteln liegen gelassen. Danach wurde der Filter zweimal mit eisgekühltem Wasser und einmal mit Lösung 2 gewaschen. Der so aktivierte Filter wurde sofort auf das Gel gelegt und der Transfer in Lösung 2 wie oben durchgeführt.

6.16 Koloniehybridisierung

Die Bakterienkolonien wurden mit einem Stempel auf Nitrozellulose-Filter, die auf Agarplatten aufgelegt worden waren, übergeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Danach wurden die Filter bei Raumtemperatur sukzessive mit folgenden Lösungen behandelt:

0,5 M NaOH	ca. 5 Min.
1 M Tris/HCl pH 7	2x 5 Min.
0,5 M Tris/HCl pH 7, 1,5 M NaCl	5 Min.
0,3 M NaCl, 0,03 M Na-citrat	10 Min.

Um die Bakterienkolonien auf den Filtern durch die Behandlung nicht wegzuschwemmen, wurden die Filter auf Whatman 3MM Chromatographie Filterpapier gelegt, welches mit diesen Lösungen getränkt worden war. Die Lösungen diffundieren durch die Nitrozellulose und reagieren mit den Bakterienkolonien.

Nachdem die Filter an der Luft getrocknet waren, wurden sie in einem Vakuumofen 3 Stunden bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei Southern Blot Analysen (5.14).

6.17 Klonierung von cDNA in bakteriellen Plasmiden

Die Klonierung wurde ohne Modifikationen der Enzymreaktionen nach der Methode von Okayama und Berg (Okayama und Berg, 1982) durchgeführt. Die Klonierungsstrategie ist im Ergebnisteil eingehend erläutert.

Die Transformation der Bakterien (E.coli, Stamm C600) mit der rekombinanten DNA geschah wie folgt: 5 ml einer Übernachtskultur wurde in 100 ml Nährmedium angeimpft und die Kultur unter heftigem Schütteln 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Alle folgenden Schritte fanden im Eisbad, bzw bei 0°C statt. Nach der Zentrifugation bei 5000 rpm im HB4 Rotor wurden die Zellen in 50 ml 50 mM CaCl₂ suspendiert und nach 10 Minuten erneut wie oben zentrifugiert. Danach erfolgte wiederum eine Resuspension in 5 ml CaCl₂ (50mM), wobei die Zellen auf keinem Fall heftig geschüttelt werden dürfen. Die Suspension wurde nun mindestens 10 Stunden im Eis stehen gelassen.

Danach wurden 200 µl Bakteriensuspension mit 100 µl DNA-Lösung (in TCM-Puffer 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂) gemischt und sukzessive im Eisbad (15 Minuten), bei 42°C (1,5 Minuten) und bei Zimmertemperatur (5 Minuten) inkubiert. Nach Zugabe von 0,8 ml Nährmedium wurden die Zellen 45 Minuten bei 37°C geschüttelt und schließlich nach Mischen mit 4 ml Softagar (0,6% Agar, bei 45°C noch flüßig) gemischt, und auf Agarplatten (1,5% Agar, 100 µg Ampicillin/ml) ausgegossen.

Nach 12 bis 24 stündiger Inkubation in einem Wärmeschrank (37°C) wurden die Kolonien gezählt, und mit sterilen Zahnstochern auf frische Agarplatten übergepickt. Achtung! Bakterienkolonien im Softagar sind nur kurze Zeit lebens-

fähig!

6.18 Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren

Für die Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren mit einem Homopolymertail wurden Sepharosesälen verwendet, an die kurze basenanaloge einzelsträngige Homopolymere kovalent gebunden sind.

Für die Chromatographie wurden die Nukleinsäuren in Wasser gelöst, die Lösung auf eine Endkonzentration von 1 Mol NaCl, 10 mmol Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mmol EDTA eingestellt und nach Erhitzen auf 60°C auf die Säule aufgetragen, die mit einem Puffer gleicher Salzkonzentration äquilibriert worden war. Die Säule wurde nun ca. 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen und danach mit einem Puffer mit obiger Salzkonzentration gespült (3 bis 5 Säulenvolumen), um nicht gebundene Nukleinsäuren zu entfernen. Die Elution erfolgte mit bidestilliertem Wasser bei Raumtemperatur.

Nach der Elution wurde die Säule mit 0,1 N NaOH gewaschen, die Lauge durch ausgiebiges Spülen mit Wasser entfernt und bei -20°C gelagert.

6.19 HPLC von Nukleinsäuren

Die HPLC Gelfiltration wurde bei Zimmertemperatur mit einem LKB Chromatographiesystem durchgeführt, das aus einer UltroPac TSK G 4000 SW Säule (60x0.75 cm), einer HPLC-Pumpe

(LKB 2150) einem SuperRac Fraktionssammler und einem UV-Monitor (LKB, VW-Monitor) bestand.

Der Chromatographiepuffer enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA, und 50 mM NaCl. Die DNA-Proben wurden in Wasser gelöst (Endkonzentration 2mg/ml), und maximal 10 μ l dieser Lösung durch einen Rheodyne Injektor auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit einer konstanten Flußgeschwindigkeit von 0,1 ml/Minute eluiert und 0,1 ml Fraktionen gesammelt. Das Effluent wurde bei 260 nm detektiert, die Peakfraktionen vereinigt und die DNA mit Ethanol bei -20° gefällt. Im Falle des Linkers (vergleiche Klonierungsstrategie) wurde die DNA durch Lyophilisierung auf das halbe Volumen konzentriert und direkt in die Versuche eingesetzt.

6.20 Bestimmung unbekannter DNA-Fragmentgrößen

Die Bestimmung unbekannter DNA-Fragmentgrößen (nach Agarosegelelektrophorese oder Southern Blot Analyse) wurde durch ein von mir entwickeltes Computerprogramm durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve dienen mit Restriktionsenzymen verdaute Plasmid- oder Phagen-DNAs (z.B. Hinf I verdaute pBR 322- oder Hind III verdaute λ -DNA) als Standard.

Nach Vorgabe der Wanderungsstrecke und Fragmentgröße des Standards berechnet der Computer mittels einer Algorithmusfunktion (Kubischer Spline) eine mathematische ideale Eichkurve entlang den vorgegebenen Eichwerten. Zu jeder vorgelegten Wanderungsstrecke eines jeden Marker-Fragments wird nun auf der Eichkurve die neu errechnete Größe des Markers bestimmt, mit der eingegebenen Größe verglichen und das Ergebnis in Zahlen sowie in prozentualer Abweichung

angegeben. Diese liegt nach meinen und den Erfahrungen vieler Kollegen bei maximal 3%.

Durch die mathematische Anlagerung von Tangenten an die Endpunkte der Eichkurve wird zusätzlich eine Bestimmung der Fragmentgröße über den Bereich der Markerpunkte hinaus ermöglicht.

Durch die Eingabe der gemessenen Wanderungsstrecke (X-Wert) eines unbekannten Fragments wird die Eichkurve nach diesem Parameter abgetastet, und die entsprechende Fragmentgröße mit möglicher maximaler Abweichung ausgegeben.

Das Computerprogramm erspart die umständliche (und sicherlich unexaktere sowie zeitraubende) graphische Darstellung der Eichkurve per Hand. Eine Ausgabe durch einen Drucker liefert zusätzlich einen guten Überblick über Qualität der Eichkurve und der berechneten Meßwerte.

6.21 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (Maxam und Gilbert, 1976) durchgeführt.

7. ABKÜRZUNGEN

Viren:

RSV:	Rous Sarcoma Virus
AMV:	Avian Myeloblastosis Virus
ALV:	Avian Leukemia Virus
MEV:	Avian Erythroblastosis Virus
SSV:	Simian Sarcoma Virus
MMTV:	Mouse Mammary Tumour Virus
SV40:	Simian Virus 40

Mengenangaben:

g:	Gramm
mg:	Milligramm
ng:	Nanogramm
pg:	Pikogramm

l:	Liter
ml:	Milliliter
μ l:	Mikroliter

m:	Mol
mmol:	Millimol
μ mol:	Mikrimol

Reagentien:

BSA:	Bovine Serum Albumin
NP 40:	Nonidet P 40 (nichtionisches Detergens)
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
Tris:	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

Einheiten:

cpm: Zähleinheiten pro Minute
 rpm: Rotationen pro Minute
 S: Svedbergeinheit

Nukleinsäuren:

DNA: Desoxyribonukleinsäure
 RNA: Ribonukleinsäure
 tRNA: Transfer-Ribonukleinsäure
 rRNA: Ribosomale Nukleinsäure
 mRNA: Messenger (=Boten) Ribonukleinsäure
 dTTP: Desoxythymidintriphosphat
 dATP: Desoxyadenosintriphosphat
 dCTP: Desoxycytidintriphosphat
 dGTP: Desoxyguanosintriphosphat
 (pC)(dG): Polycytidylsäure und basengepaarte
 Oligodesoxyguanylsäure
 (pA)(dT): Polyadenylsäure und basengepaarte
 Oligodesoxythymidylsäure
 λ -DNA: DNA des Bakteriophagen Lambda

Enzyme:

DNase: Desoxyribonukleinsäurespaltendes Enzym
 RNase: Ribonukleinsäurespaltendes Enzym

Sonstiges:

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium
 E.coli: Escherichia coli

1. LITERATUR

- Allet, B. (1979)
Mu insertion duplicates a 5 base pair sequence at the
host inserted site. Cell 16, 123-129
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., and G.R. Stark (1979)
Method for detection of specific RNAs in agarose gels
by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and
hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 74, 5350-5354
- Arkhipova, I.R., Gorelova, T.V., and Schuppe, N.G. (1984)
Reverse transcription of Drosophila mobile dispersed
element RNAs: detection of intermediate forms. Nucl.
Acid Res. 12, 7533-7548
- Astrin, S.M. (1978)
Endogenous viral genes of the white leghorn chicken:
Common site of residence and sites associated with
specific phenotypes of viral gene expression. Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5941-5945
- Astrin, S.M., Buss, E.G., and Hayward, W.S. (1979)
endogenous viral genes are non-essential in the
chicken. Nature, 282, 339-341
- Astrin, S.M., Robinson, H.L., Crittenden, L.B., Buss, E.G.,
Wyban, J., and Hayward, W.S. (1979)
Ten genetic loci in the chicken that contain structural
genes for endogenous avian leukosis viruses. Cold
Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 44, 1105-1109
- Astrin, S.M., Crittenden, L.B., and Buss, E.G. (1980)
ev2, a genetic locus containing structural genes for
endogenous virus, codes for Rous-associated virus type
0 produced by line 7/2 chickens. J. Virol. 33, 250-255
- Baltimore, D. (1970)
RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor
viruses. Nature 226, 1209-1211
- Baltimore, D. and Smoler, D. (1971)

Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA tumor viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1507-1511

- Bauer, G., and Hofschneider, P.H. (1976)
An RNA-dependent DNA polymerase, different from the known viral reverse transcriptase, in the chicken system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3025-3029
- Bauer, G., Jilek, G., and Hofschneider, P.H. (1977)
Characterization of a new reverse transcriptase of possibly cellular origin in the chicken system. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 27, 1b, 215-220
- Bauer, G., Jilek, G., and Hofschneider, P.H. (1977)
Purification and further characterization of an RNA-dependent DNA polymerase from the allantoic fluid of leukosis-virus-free chicken eggs. Eur. J. Biochem. 79, 345-354
- Bauer, G., Friis, R.R., Jilek, G., and Hofschneider, P.H. (1978)
Purification and characterization of particles containing RNA-dependent DNA polymerase, in the allantoic fluid of uninfected leukosis-free chicken eggs. Biochem. Biophys. Acta 518, 125-137
- Bauer, G., Friis, R.R., Mattersberger, H., and Hofschneider, P.H. (1978)
Controlled release of particle-associated RNA-dependent DNA polymerase by primary chick embryo cell cultures. Exp. Cell Res. 117, 383-392
- Bauer, G., Mattersberger, H., Soo, R., Jendis, J., and Hofschneider, P.H. (1978)
Release of particle associated RNA-dependent DNA polymerases by primary chicken and quail embryo cells. Modern Trends in Human Leukemia III, 576-579 (ed. R.Neth, R.C.Gallo, P.H.Hofschneider, and K.Mannweiler)
- Bentley, D.L. and Rabbits, T.H. (1980)
Human immunoglobulin variable region genes - DNA sequences of two V kappa genes and a pseudogene. Nature 288, 730-733
- Bishop, J.M. (1983)
Cellular oncogenes and retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 52, 301-354

- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. A. Res.* 7, 1513-1523
- Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., and Tinoco, I. (1974)
Physical chemistry of nucleic acids (ed. by Woods, J.A., and Wernick, L.), New York: Harper and Row
- Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R., and Tonegawa, S. (1978)
Complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15, 1-14
- Burr, B., and Burr, F.A. (1983)
Gene control in maize by transposable elements. *Gene Structure and Regulation in Development* ed. Alan R. Liss Inc. New York, 185-195
- Brown, A.L. (1984)
On the origin of the Alu family of repeated sequences. *Nature* 312 vol. 8, 106
- Canaani, E., Cohen, J.B., Drazan, O., Horowitz, M., Unger, T., and Klar, A. (1984)
Transposition of endogeneous intracisternal A-particle genomes into the c-mos oncogene. *Cancer Cells* 2, 295-301
- Chen, H.R. and Barker, W.C. (1984)
Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions. *Nucl. Acid Res.* 12, 1767-1778
- Claude, A. Porter, K.R., and Pickels, E.G. (1947)
Electron microscope study of chicken tumour cells. *Cancer Res.* 7, 421
- Coffin, J.M., Champion, M., and Chabot, F. (1977)
Genome structure of avian RNA tumor viruses: Relationship between exogeneous and endogeneous viruses. *The Proceedings of the ICREW-EMBO Workshop on Avian Tumorviruses* (ed. Barlati, S., and DeGuili, C.)
- Coffin, J.M., and Haseltine, W.A. (1977)
Terminal redundancy and the origina of replication of Rous sarcoma virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1908-1912

- Coffin, J.M., Champion, M., and Chabot, F. (1978)
Nucleotide sequence relationships between the genomes of an endogeneous and an exogenous avian tumor virus. *J. Virol.* 28, 972-991
- Coffin, J.M., Tsichlis, P.N., Barker, C.S., and Voynow, S. (1981)
Variation in avian retroviruses genomes. *Ann. New York Acad. Sci.* 54, 410-425
- Cole, M.D., Ono, M., and Huang, R.C.C. (1981)
Terminally redundant sequences in cellular intracisternal A-particle genes. *J. Virol.* 38, 680
- Crawford, L.V. and Crawford, E.M. (1961)
The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation. *Virology* 13, 227
- Crick, F. (1970)
Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-563
- Dalton, A.J., Potter, M., and Merwin, R.M. (1961)
Some ultrastructural characteristics of a series of primary and transplanted plasma cell tumors of the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 26, 1221
- DeLorbe, W.J., Luciw, P.A., Goodman, H.M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1980)
Molecular cloning and characterization of Avian Sarcoma Virus circular DNA molecules. *J. Virol.* 36, 50-61
- Denison, R.A., van Arsdel, S.W., Bernstein, L.B., and Weiner, A.M. (1981)
Abundant pseudogenes for small nuclear RNAs are dispersed in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 810-814
- Dhar, R. McClements, W.L., Enquist, L.W. and Vande Woude, A.F. (1980)
Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma virus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3937-3941
- Dougherty, R.M. and DiStefano, H.S. (1966)
Lack of relationship between infection with avian leukosis virus and the presence of COFAL antigen in chick embryos. *Virology* 29, 586-595

- Duesberg, P.H. (1968)
Physical properties of Rous sarcoma virus RNA. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 60, 1511-1518
- Dugaiczky, A., Boyer, H.W., and Goodman, H.M. (1975)
Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA-fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol. 96, 171-184
- Dunsmuir, P., Brorein, W.J., Simon, M.A., and Rubin, G.M. (1980)
Insertion of the Drosophila transposable element copia generates a 5 base pair duplication. Cell 21, 575-579
- Efstratiadis, A., and Villa-Komaroff, L. (1979)
Cloning of double-stranded cDNA, p 1-14. In J.K. Setlow and A. Hollaender, ed., Genetic Engineering, vol. 1. Plenum Press, New York.
- Ellermann, V. und Bang, O. (1908)
Experimentelle Leukemia bei Hühnern. Centralbl. Bakteriologie. Abt. 1 (Org) 46, 595
- Ellermann, V. und Bang, O. (1909)
Experimentelle Leukemia bei Hühnern. Z. Hyg. Infekt. 63, 231
- Fedoroff, N. (1983)
Controlling elements in maize. In "Mobile Genetic Elements", ed. J. Shapiro, New York: Academic 1-63
- Freeling, M. (1984)
Plant transposable elements and insertion sequences. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 277-298
- Fujinuma, A. und Inamoto, K. (1914)
Über Geschwülste bei japanischen Haushühnern, insbesondere über einen transplantablen Tumor. Z. Krebsforschung 14, 94
- Furiuchi, Y., Shatkin, A.J., Stavneyer, E., and Bishop, J.M. (1975)
Blocked, methylated 5' terminal sequence in avian sarcoma virus RNA. Nature 257, 618-620
- Graeve, L., Goemann, W., Földi, P., and Kruppa, J. (1982)
Fractionation of biologically active messenger RNAs by

HPLC gel filtration. *Biophys. Res. Commun.* 107, 1559

Graeve, L., Földi, P., and Kruppa, J. (1983)
Purification of low-molecular-weight RNAs by high-performance gel permeation chromatographie. *J. Chromatogr.* 268, 506

Green, M.M. (1981)
Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. *Annu. Rev. Genet.* 14, 109-120

Grunstein, M., and Hogness, D.S. (1975)
Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3961-3965

Halpern, M.S., Wade, E., Rucker, E., Levine, A.S., Baxter-Gabard, K.L., and Friis, R.R. (1973)
A study of the relationship of reticuloendotheliosis virus to the avian leukosis-sarcoma complex of viruses. *Virology* 53, 287-299

Hanafusa, H., Miyamoto, T., and Hanafusa, T. (1970)
A cell-associated factor essential for formation of an infectious form of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 66, 314-321

Hanafusa, H., Aoki, T., Kawai, S., Miyamoto, T., and Wilsnack, R.E., (1973)
Presence of antigen common to avian tumor viral envelope antigen in normal chick embryos. *Virology* 56, 22-32

Hanafusa, T., Hanafusa, H., and Miyamoto, T. (1970)
Recovery of a new virus from apparently normal chick cells by infection with avian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 67, 1797-1803

Hanafusa, T., Hanafusa, H., Miyamoto, T., and Fleissner, E. (1972)
Existence and expression of tumor virus genes in chick embryo cells. *Virology* 47, 475-482

Hanahan, D., and Meselson, M. (1980)
Plasmid screening at high colony density. *Gene* 10, 63-67

Harbers, K., Schnieke, A., Stuhlmann, H., Jaehner, D., and Jae-

- nisch,R. (1981)
DNA methylation and gene expression: endogeneous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 78, 7609-7613
- Haseltine,W.A., Maxam,A.M., and Gilbert,W. (1977)
Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the 5' sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 989-993
- Hawley,R.G., Shulman,M.J., and Hozumi,N. (1984)
Intracisternal A-particle genes: a family of copia-like transposable elements in *Mus musculus*. *Cancer Cells Series* 2, 273-279
- Hayward,W.S., and Hanafusa,H. (1973)
Detection of avian tumor virus RNA in uninfected chicken embryo cells. *J.Virol.* 11, 157-167
- Hayward,W.S., and Hanafusa,H. (1975)
Recombination between endogeneous and exogeneous tumor virus genes as analyzed by nucleic acid hybridization. *J.Virol.* 15, 1367-1377
- Hayward,W.S., Braverman,S.B., and Astrin,S.M. (1980)
Transcriptional products and DNA structure of endogeneous avian proviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* 44, 1111-1121
- Hughes,S.H., Toyoshima,K., Bishop,J.M., and Varmus,H.E. (1981)
Organization of the endogeneous Proviruses of chickens: Implication for origin and expression. *Virology* 108, 189-207
- Hughes,S.H. (1982)
Sequence of the long terminal repeat and adjacent segments of the endogeneous avian virus Rous-associated virus 0. *J.Virol.* 43, 191-200
- Hughes,S.H. (1983)
Synthesis, Integration, and transcription of the retroviral provirus. *Curr. T. Micr.* 103, 23-49
- Jaenisch,R. (1982)
endogeneous Retroviruses. *Cell* 32, 5-6

- Jagadeeswaren,P., Forget,B.G., and Weissman,S.M. (1981)
Short interspersed repetitive DNA elements in eucariotes: Transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III transcripts? Cell 26, 141-142
- Jacob,F. und Monod,J. (1961)
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356
- Jordan, Saedler, und Starlinger (1968)
O⁶ strong polar mutations in the gal operon are insertions. Molec. Gen. Genetics 102, 353
- Liebermann,D., Hoffman-Liebermann,B., and Sachs,L. (1980)
Regulation of endogeneous type C virus expression during normal myeloid cell differentiation. Virol. 107, 121-134
- Lueders,K.K., and Kuff,E.L. (1977)
Sequences associated with intracisternal A particles are reiterated in the mouse genome. Cell 12, 963
- Lueders,K.K., and Kuff,E.L. (1980)
Intracisternal A particles genes: Identification in the genome of Mus musculus and comparison of multiple isolates from a mouse gene library. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 3571
- Kang,C.-Y., and Temin,H.M. (1972)
endogeneous RNA-directed DNA polymerase activity in uninfected chicken embryos. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1550-1554
- Kang,C.-Y., and Temin,H.M. (1973)
Lack of sequence homology among RNAs of avian leukosis-sarcoma viruses, reticuloendotheliosis viruses, and chicken endogeneous RNA-directed DNA polymerase activity. J.Virol. 12, 1314-1324
- Kang,C.-Y., and Temin,H.M. (1973)
Early DNA-RNA complex from the endogeneous RNA-directed DNA ploymerase activity of uninfected chicken embryos. Nature N. Biol. 242, 206-208
- Kato,Y., Sasaki,M., and Hashimoto,T. (1983)
Operational variables in high-performance gel fil-

tration of DNA fragments and RNAs. J. Chromatography
266, 341

Keith, J. and Fraenkel-Conrat, H. (1975)
Identification of the 5'-end of Rous sarcoma virus RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 9, 3347-3350

Kleckner, N. (1981)
Transposable elements in prokaryotes. Ann. Rev. Genet.
15, 341-404

Kugimiya, W., Ikenaga, H., and Saigo, K. (1983)
Close relationship between the long terminal repeats of
avian leukosis-sarcoma virus and copia-like movable
genetic elements of Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 80, 3193-3197

Kuff, E.L., Lueders, K.K., Ozer, H.L., and Wivel, N.A. (1972)
Some structural and antigenic properties of intracis-
ternal A particles occurring in mouse tumors. Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 218

Kuff, E.L., Feenstra, A., Lueders, K.K., Smith, L.A.,
Hawley, R.G., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1980)
Intracisternal A-particle genes: identification in the
genome of *Mus musculus* and comparison of multiple
isolates from a mouse gene library. Proc. Natl. Acad.
Sci. 77, 3571

Kuff, E.L., Smith, L.A., and Lueders, K.K. (1981)
Intracisternal A-particle genes in *Mus musculus*: A
conserved family of retrovirus-like elements. Mol. Cell
Biol. 1, 216

Kuff, E.L., Feenstra, A., Lueders, K.K., Smith, L.A.,
Hawley, R.G., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1983)
Intracisternal A-particle genes as movable elements in
the mouse genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80,
1992

Lehman, I.R. (1974)
DNA Ligase: Structure, Mechanism and Function. Science
186, 790-797

Mandel, M., and Higa, A. (1970)
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol.
Biol. 53, 159-162

- Martin, G.S. (1970)
Rous sarcoma virus infection: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227, 1021-1023
- McClintock, B. (1942)
The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 28, 458-463
- McClintock, B. (1956)
Intranuclear systems controlling gene action and mutation. *Brookhaven Symp. Biol.* 8, 58-74
- McClintock, B. (1956)
Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21, 197-216
- McClintock, B. (1978)
Mechanisms that rapidly reorganize the genome. *Stadler Genet. Symp.* 10, 25-48
- Melli, M., Whitefield, C., Rao, K.V., Richardson, M., and Bishop, J.O. (1971)
DNA-RNA hybridization in vast DNA excess. *Nature (London)* 231, 8-12
- Moelling, K., Bolognesi, D.P., Bauer, H., Büsen, W., Plassmann, H.W. and Hausen, P. (1971)
Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids. *Nature New Biol.* 234, 240-243
- Mondal, H., Jendis, J., and Hofschneider, P.H. (1980)
Organ-specific expression of particle-bound reverse transcriptase during different stages of quail embryogenesis. *Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation*, Vol. 7, Cold Spring Harbor Laboratory
- Mondal, H. and Hofschneider, P.H. (1983)
Demonstration of free reverse transcriptase in the nuclei of embryonic tissues of the Japanese quail. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 303-311
- Mondal, H. and Hofschneider, P.H. (1982)
Isolation and characterization of retrovirus-like elements from normal Human fetuses. *Int. J. Cancer* 30,

281-287

Mondal, H. (1977)

Occurrence of particle-bound reverse transcriptase in human amniotic fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 67

Morse, H.C., Taylor, B.A., Kozak, C.A., Chused, T.M., Sharrow, S. O., Hartley, J.W., and Stockert, E. (1982)

Expression on normal lymphocytes of two cell surface antigens, XenCSA and GIX, related to the major glycoproteins (gp70) of murine leukemia viruses. *J. Immunol.* 128, 2111-2115

Neiman, P.E. (1972)

Rous sarcoma virus nucleotide sequences in cellular DNA: Measurements by RNA-DNA hybridizations. *Science* 178, 750-752

Neiman, P.E. (1973)

Measurement of endogeneous leukosis virus nucleotide sequences in the DNA of normal avian embryos by RNA-DNA hybridization. *Virology* 53, 196-204

Neiman, P.E., Das, S., Mac Donell, D., and McMillin, C. (1977)

Organization of shared and unshared sequences in the genome of chicken endogeneous and sarcoma viruses. *Cell* 11, 321-329

Ohshima, Y., Okada, N., Tani, T., Itoh, Y., Itoh, M., (1981)

Nucleotide sequence of mouse genomic loci including a or pseudogene for U6 (4.8S) nuclear RNA. *Nucl. Acid Res.* 9, 5145-5158

Okayama, H. and Berg, P. (1982)

High-efficiency Cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170

Ono, M., Cole, M.D., White, A.T., and Huang, R.C.C. (1980)

Sequence organization of cloned intracisternal A-particle genes. *Cell* 21, 465

Panganiban, A.T., and Temin, H.M. (1984)

Circles with two tandem LTRs are Precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell*, 36, 673-679

Paterson, B.M., Segal, S.S., Lueders, K.K., and Kuff, E.L. (1978)

- RNA associated with murine intracisternal type A particle codes for the main particle protein. *J. Virol.* 27, 118
- Payne, L.N., and Chubb, R.C. (1968)
Studies on the nature and genetic control of an antigen in normal chick embryos which reacts in the COFAL test. *J. Gen. Virol.* 3, 379-391
- Potter, S.S. (1982)
DNA sequence of a foldback transposable element in *Drosophila*. *Nature*, 297 (5863), 201-204
- Potter, S.S. (1982)
DNA sequence analysis of a *Drosophila* foldback transposable element rearrangement. *MGG*, 188 (1), 107-110
- Rabbitts, T.H. (1976)
Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA. *Nature (London)* 260, 221-225
- Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J. (1967)
A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1514-1520
- Rasheed, S. (1982)
Role of endogeneous cat retrovirus in cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7371-7375
- Rechavi, G., Givol, D., Canaani, E. (1983)
Activation of a cellular oncogene by DNA rearrangement: Possible involvement of an IS-like element. *Nature* 300 (5893), 607-611
- Roberts, R.J. (1979)
Directory of restriction endonucleases. *Methods in Enzymology*, Vol. 68, 27-41
- Robinson, W.S. and Baluda, M.A. (1965)
The nucleic acid from avian myeloblastosis virus compared with the RNA from the Bryan strain of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1686-1692

- Robinson, H.L., Astrin, S.M., Senior, A.M. and Salazar, F.H. (1981)
Host susceptibility to endogeneous viruses: defective glycoprotein-expression proviruses interfere with infections. *J. Virol* 40, 745-751
- Rose, J.K., Haseltine, W.A., and Baltimore, D. (1976)
5'-Terminus of moloney murine leucemia virus 35S RNA is m7G5'ppp5'GmpCp. *J. Virol.* 20, 324-329
- Rosenthal, P.W., Robinson, H.L., Robinson, W.S., Hanafusa, T., and Hanafusa, H. (1971)
DNA in uninfected and virus-infected cells complementary to avian tumour virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2236-2340
- Rovigatti, U.G. and Astrin, S.M. (1983)
Avian endogeneous viral genes. *Curr. T. Micr.* 103, 1-21
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977)
Labeling deoxyribonucleic Acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251
- Rose, J.K., Haseltine, W.A., and Baltimore, D. (1976)
5'-Terminus of moloney murine leucemia virus 35 S RNA is m7G5'pppGmpCp. *J. Virol.* 20, 324-329
- Rougeon, F., Kourilsky, P., and Mach, B. (1975)
Insertion of a rabbit β -globin gene sequence into an E.coli plasmid. *Nucleic Acid Res.* 2, 2365-2378
- Rous, P. (1911)
A sarcoma of the fowl transmissible by an agent from the tumour cells. *J. Exp. Med.* 13, 397
- Rubin, G.M., Collins, M., Karess, R.E., Levis, R., Murphey, C., and O'Hare, K. (1983)
Transposable genetic elements in *Drosophila*. In "Gene Structure and Regulation in Development" ed. Alan R. Liss, Inc. New York, 213-224
- Rushlow, K.E., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Baluda, M.A., Perbal, B., Chirikjian, J.G., and Reddy, E.P. (1982)
Science 216, 1421-1423

- Schidlovsky, (1979)
- Schmid,C.W., and Jelinek,W.R. (1982)
The Alu family of dispersed repetitive sequences.
Science, 216 (4550), 1065-1070
- Schwartz,D.E., Zamecnik.P.C., and Weith,H.L. (1977)
Rous sarcoma virus genome is terminally redundant: the
3' sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 994-998
- Shank,P.R., Hughes,S.H., and Varmus,H.E. (1981)
Restriction endonuclease mapping of the DNA of
Rous-associated Virus 0 reveals extensive homology in
structure and sequence with avian sarcoma virus DNA.
Virol. 108, 177-188
- Shapiro,J.A. (1983)
Changes in gene order and gene expression. Natl. Cancer
Inst. Monogr. (60), 87-110
- Shiba,T and Saigo,K. (1983)
Retrovirus-like particles containing RNA homologous to
the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*.
Nature, 302 119-125
- Saigo,K., Kugimiya,W., Matsuo,Y., Inouye,S., Yoshioka,K.
and Yuki,S. (1984)
Identification of the coding sequence for a reverse
transcriptase-like enzyme in a transposable genetic
element in *Drosophila melanogaster*. Nature 312, 659-661
- Shimotohono,K., Mizutani,S., and Temin,H.M. (1980)
Sequence of retrovirus provirus resembles that of
bacterial transposable elements. Nature 285, 550-554
- Shimotohono,K. and Temin,H. (1980)
No apparent nucleotide sequence specificity in cellular
DNA juxtaposed to retrovirus proviruses. Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 77, 7357-7361
- Shoyab,M., and Baluda,M.A. (1976)
Ribonucleotide sequence homology among avian oncornaviruses.
J.Virol. 17, 106-113
- Southern,E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments

separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

Southern, E.M. (1979)

Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods in Enzymology, Vol. 68, 152-176

Spiegelmann, S., Burney, A., Das, M.R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M., and Watson, K.
Nature 227, 1029

Stephenson, M.L., Scott, J.F., and Zamecnik, P.C. (1973)

Evidence that the polyadenylic acid segment of "35 S" RNA of avian myeloblastosis virus is located at the 3'-OH terminus. Biophys. Res. Commun. 55, 8-16

Streeck, R.E. (1982)

A multicopy insertion sequence in the bovine genome with structural homology to the long terminal repeats of retroviruses. Nature, 298 (5876), 767-769

Sutcliffe, J.C. (1978)

pBr 322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucl. Ac. Res. 5, 2721-2728

Tanaka, T., and Weisblum, B. (1975)

Construction of a colicin El-R Factor composite plasmid in vitro: Means for amplification of deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 121, 354-362

Temin, H.M. (1964)

Nature of the provirus of Rous sarcoma. Nat. Cancer Inst. Monograph 17, 557-570

Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970)

RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226, 1211-1213

Temin, H.M. (1971)

The provirus hypothesis. J. Nat. Cancer Inst. 46, III-VIII

Temin, H.M. (1972)

The provirus hypothesis and cancer. RNA-Viruses and Host Genomes in Oncogenesis, ed. by P. Emmelot,

P.Bentvelzen, 35-361. Amsterdam/ London: North Holland

Temin,H.M. (1980)

Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. Cell 21, 599-600

Temin, H.M. (1982)

Viruses, Protoviruses Development and evolution. J. Cell. Biochem. 19. 105-118

Tereba,A. and Astrin,S.M. (1980)

Chromosomal localization of evl, a frequently occurring endogeneous retrovirus locus in White Leghorn chickens, by in situ hybridization. J. Virol. 35, 888-894

Tereba,A., Crittenden,B., and Astrin,S.M. (1981)

Chromosomal localization of three endogeneous retrovirus loci associated with virus production in White Leghorn chickens. J. Virol. 39, 282-289

Tereba,A. (1981)

5'-Terminal deletions are a common feature of endogeneous retrovirus loci located on chromosome 1 of white leghorn chickens. J. Virol. 40, 920-926

Tereba,A. (1983)

Asymmetric chromosomal Distribution of endogeneous retrovirus loci in chickens and mice. Cuur. T. Micr. 107, 29-50

Thomas,C.A., Berns,K.I.Jr., and Kelly,T.J.Jr. (1974)

Isolation of high molecular weight DNA from bacteria and cell nuclei. In "Procedures in Nucleic Acid Research" Vol.2, (ed. Cantoni,G.L., and Davies,D.R.) Harper and Row, New York, Evanston, San Francisco, London.

Ullu,E., and Tschudi,C. (1984)

Alu sequences are processed 7SL RNA genes. Nature 312 Vol.8, 171-172

Vanin,E.F., Goldberg,G.I., Tucker,P.W., and Smithies,O. (1980)

A mouse alpha-globin-related pseudogene lacking intervening sequences. Nature 286, 222-226

- Varmus, H.E. (1982)
Form and function of retroviral proviruses. *Science* 216, 812-820
- Vogt, P.K. and Friis, R.R. (1971)
An avian leukosis virus related to RSV(0): properties and evidence for helper activity. *Virology* 43, 223-234
- Vogt, V.M., Eisenmann, R., and Diggelman, H. (1975)
Generation of avian myeloblastosis virus structural proteins by proteolytic cleavage of a precursor polypeptide. *J. Mol. Biol.* 96, 471-493
- Wahl, G.M., Stern, M., and G.R. Stark (1979)
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3683-3687
- Watson, J.D. and Crick, F.C.H. (1953)
Molecular structure of nucleic acids: A structure for desoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 737-738
- Weiss, R.A. (1969)
The host range of BRYAN strain Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus. *J. Gen. Virol.* 5, 511-528
- Weiss, R.A., Friis, R.R., Katz, E., and Vogt, P.K. (1971)
Induction of avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens. *Virology* 46, 920-938
- Weiss, R.A., and Biggs, P.M. (1972)
Leukosis and Marek's disease viruses of feral red jungle fowl and domestic fowl in Malaysia. *J. Nat. Cancer Inst.* 49, 1713-1725
- Will, B.M., Bayev, A.A., Finnegan, D.J. (1982)
Nucleotide sequence of terminal repeats of 412 transposable elements of *Drosophila melanogaster*. A similarity to proviral long terminal repeats and its implications for the mechanism of transposition. *J. Mol. Biol.* 153 (4), 897-915
- Wilson, S.H., and Kuff, E.L. (1972)
A novel DNA polymerase activity found in association with intracisternal a-type particles. *Proc. Natl. Acad.*

Sci.

- Wood, K.O., and Lee, J.C. (1976)
Integration of synthetic globin genes into an E.coli plasmid. Nucleic Acid Res. 3, 1961-1971
- Wright, S.E., and Neiman, P.K. (1974)
Base-sequence relationships between avian ribonucleic acid endogeneous and sarcoma viruses assayed by competitive ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. Biochem. 13, 1549-1554
- Yang, S.S., and Wivel, N.A. (1973)
Analysis of high-molecular weight ribonucleic acid associated with intracisternal A particles. J. Virol. 11, 287
- Yoshikawa-Fukada, M., and Ebert, J.D. (1969)
Hybridization of RNA from Rous sarcoma virus with cellular and viral DNA's. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64, 870-877
- Young, E.T., and Sinsheimer, R.L. (1965)
Initial Actions of Spleen Deoxyribonuclease and pancreatic deoxyribonuclease. J. Biol. Chem. 240, 1274-1280
- Zabeau, M., and Roberts, R.J. (1979)
The role of restriction endonucleases in molecular genetics. In "molecular Genetics" III, (ed. Taylor, J.H.), Academic Press

Hiermit erkläre ich, daß ich außer den im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen keinerlei Hilfsmittel benutzt habe. Mit Ausnahme der DNA-Sequenzierung wurde die experimentelle Arbeit von mir selbständig und ohne fremde Hilfe durchgeführt.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Ralph Dornburg', with a stylized, flowing script.

Martinsried bei München,

Ralph Dornburg

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 12. 8. 1952
Geburtsort: Nürnberg

Schulen:

Grundschule Nürnberg
am Bielingplatz 1959-1963

Melanchthon-Gymnasium
Nürnberg 1962-1972
Abitur 1972

akademische Ausbildung:

Studium der Chemie an der
Universität Erlangen-Nürnberg 1973-1976

Studium der Biologie an der
Universität Tübingen 1976-1977
Vordiplom 1977

Studium der Biologie an der
Universität München 1977-1981
Diplom 1981

Doktorarbeit unter Anleitung
von Prof. P.H. Hofschneider
am Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried Okt. 1981 -
Juli 1985

